



Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Rescate folicular y regeneración del nicho ovárico mediante células madre humanas derivadas de la médula ósea

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Anna Buigues Monfort

Dirigida por:

Prof. Antonio Pellicer Martínez

Dra. Sonia Herraiz Raya

Dr. César Díaz García

Valencia, septiembre 2019



Prof. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático en Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, fundador del Instituto Valenciano de Infertilidad y presidente de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Rescate folicular y regeneración del nicho ovárico mediante células madre humanas derivadas de la médula ósea”** ha sido realizado íntegramente por Anna Buigues Monfort bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 17 de septiembre de 2019.

Fdo. Prof. Antonio Pellicer Martínez



Dra. **Sonia Herraiz Raya**, Doctora en Biología, Investigadora principal del área de Rejuvenecimiento ovárico y Preservación de la fertilidad en Fundación IVI (FIVI) y miembro del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Rescate folicular y regeneración del nicho ovárico mediante células madre humanas derivadas de la médula ósea”** ha sido realizado íntegramente por Anna Buigues Monfort bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 17 de septiembre de 2019.

Fdo. Dra. Sonia Herraiz Raya



Dr. César Díaz García, Doctor en Medicina y Cirugía, Director Médico del IVI-London y miembro del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del IIS la Fe.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Rescate folicular y regeneración del nicho ovárico mediante células madre humanas derivadas de la médula ósea”** ha sido realizado íntegramente por Anna Buigues Monfort bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 17 de septiembre de 2019.

Fdo. Dr. César Díaz García

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos cuatro años he pensado muchas veces que este momento no llegaría nunca. Pero ahora que por fin ha llegado no sé ni por dónde empezar. Han sido años enriquecedores, tanto profesional como personalmente, pero también complicados. Y sin duda alguna hoy no estaría aquí sin la ayuda y el apoyo de todos los que han estado a mi lado a lo largo de esta etapa.

Aún recuerdo el día que me dieron la beca para realizar este proyecto. Nunca olvidaré la mezcla de emoción, nervios y miedo que sentí al saber que por fin podía hacer aquello que tantos años había deseado y que tanto esfuerzo me había costado. Desde que tengo memoria he tenido una gran inquietud por conocer cosas nuevas, por descubrir el porqué de todo aquello que me rodea, en especial de todo lo que tenga que ver con la vida. Y ¿qué mejor para ello que realizar la tesis en un problema como lo es la dificultad o no posibilidad de crear vida? Es verdad que a lo largo de estos 4 años esa ilusión, inquietud, ganas y motivación se han disipado por momentos, pues cualquiera que haya realizado una tesis doctoral sabe las dificultades y complicaciones que conlleva. Pero, pese a ello, han sido años de gran aprendizaje, de sueños cumplidos y de grandes oportunidades. Así que solo puedo agradecer a todos aquellos que han estado a mi lado y han hecho, de un modo u otro, que hoy pueda estar aquí escribiendo estas palabras.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis la ayuda y enseñanza de estos años. Al Dr. Antonio Pellicer por la oportunidad que me brindó al ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis doctoral a su lado. Por toda su implicación, interés y ayuda en el proyecto y por confiar en mí para llevarlo a cabo. A Sonia Herraiz, por haber estado ahí en todo momento. Por toda tu ayuda, tus ideas y apoyo, por enseñarme tanto, por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía y por ofrecerme la oportunidad de participar y formar parte de tantas cosas. Porque de lo mejor que me llevo de esta etapa es la diversidad de cosas que he aprendido y eso sin duda es gracias a ti, al igual que lo es esta tesis. Has sido absolutamente fundamental en que pudiese llevar a cabo este trabajo. Y finalmente, a César Díaz, por todos sus consejos e ideas para mejorar el trabajo, así como por darme la oportunidad de trabajar y de aprender tanto a su lado.

La realización de esta tesis no hubiese sido posible sin la ayuda de las veterinarias del animalario de la Facultad de Medicina Ana Díaz y Eva Blanch. Gracias por vuestra

paciencia y entrega. Porque a vuestro lado he aprendido muchas cosas y he superado con creces esa fobia que desde niña he tenido a los roedores.

No menos importante ha sido la colaboración en el proyecto del personal del Departamento de Hematología y del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital la Fe. Gracias a todos ellos por haber participado y enriquecido este trabajo.

Es cierto que son muchas las personas a las que he de agradecer esta tesis. Pero creo que hay una que sin duda alguna se merece una mención especial. Y esa no es otra que Jessica. Porque has estado ahí desde el primer momento, porque hemos crecido juntas (tanto profesional, como personalmente). Te lo he dicho muchas veces, pero tu amistad es una de las cosas más valiosas que me llevo de estos años. Gracias por sacarme una sonrisa incluso en el peor de los días. Gracias por tu alegría y tu locura. Por tu creatividad e imaginación. Por tu talento y tu dulzura. Gracias por estar ahí en los buenos y en los malos momentos. Porque has sido la mejor compañera de trabajo que podría haber tenido. Esa que se queda contigo hasta las tantas de la noche si hace falta para que no estés sola. Esa que te anima en los días en los que lo ves todo negro. El mejor hombro sobre el que llorar y también el mejor hombro sobre el que reír. Gracias por todos y cada uno de los momentos que hemos pasado juntas. Ojalá pueda seguir trabajando a tu lado muchos años más, porque es el mejor regalo.

Pero no puedo olvidarme del resto de mis compañeras de la universidad, de mis “Antonias”. A Horten, gracias por acogerme como lo hiciste cuando recién salida de la carrera me incorporaba al mundo de la investigación. Porque pese a todo, siempre has estado a mi lado, me has arropado en los peores momentos y me has dado la fuerza que necesitaba para continuar. Gracias por todo tu cariño y por tu fuerza, esa fuerza que tanto me ha ayudado. A Mercedes porque, aunque ahora no podamos compartir nuestro día a día, fueron muchos los momentos que vivimos juntas en mis inicios. Gracias por estar entonces y por seguir estando ahora pese a la distancia.

También a Víctor porque, aunque al principio te costó socializar conmigo, te has convertido en un apoyo muy importante para mí en estos últimos años. Gracias por esos reconfortantes abrazos, por tu cariño y por las risas que nos hemos echado.

A María, porque desde el primer momento nuestra conexión y compañerismo ha sido inigualable. Gracias por hacer tan fácil trabajar contigo, por tus ganas de aprender, por

tu motivación y tu compromiso. Porque es difícil encontrar personas con las que trabajar sea tan fácil como lo es contigo. Gracias también por ser no solo una gran compañera de trabajo, sino una gran amiga y un gran apoyo.

A Luis, por todo su cariño y amistad. Porque siempre has estado ahí cuando más lo necesitaba. Gracias por todos tus consejos, por todas tus palabras. Sin ti, estos últimos años y, en especial, estos últimos meses hubiesen sido muchísimo más complicados de lo que lo han sido. Gracias por acompañarme, junto a Maria José, en mis actuaciones o intentos de actuaciones.

A Maria José, per ser com és i per sempre escoltar-me. Per entendre'm en tot moment, per cuidar-me, per ajudar-me. Perquè he après molt de tu, tan professional com personalment. Per les nostres actuacions teatrals i xerrades improvisades en cultius, per les nostres cançonetes en el laboratori. Per les nostres hores juntes en la bancada fent qPCRs o qualsevol altra cosa. Perquè al teu costat tot és millor.

A mis compañeras de Fundación IVI que ya no están aquí, aunque no por ello me acuerdo menos de ellas. En especial a Silvia, mi vecina de trabajo y de casa. Mi compañera de autobús en los viajes de ida y vuelta. Gracias por ofrecerme la ayuda que necesitaba cuando más la necesitaba. Nunca olvidaré todo lo que has hecho por mí. También a Nuria, por su cariño y apoyo, por su amistad y carisma. Porque, aunque sé que a veces soy un desastre manteniendo las relaciones a distancia, has sido, eres y serás una persona muy especial en mi vida.

A Patricia Sebastián, porque tu experiencia y tus palabras me han ayudado en muchísimos momentos. Gracias por todas esas risas en las clases de inglés y por todos esos abrazos que recomponen y alegran a cualquiera.

A Ana Corachán y a Hannes, por vivir esta experiencia a mi lado y por ayudarme tanto en todos los trámites y dificultades de estos últimos meses. Gracias de corazón.

A Irene Cervelló, Patricia Díaz y Paco Domínguez no solo por enriquecer y mejorar esta tesis con vuestras sugerencias y comentarios sino también por todo vuestro apoyo y ayuda en los momentos más complicados.

Al resto de mis compañeros de Fundación IVI porque, aunque no es posible dirigiros unas palabras a todos y cada uno de vosotros, quiero que sepáis que habéis sido unos compañeros de 10. A Amparo y a Alicia, a Livia, a Robert, a Lucía, a Sara, a María Cristina, a Yassmin, a Almudena, a Rosalba, a Pepi, a Alejandro, a Pablo, a Marcos, a

Carmen y a Inma. Gracias por estos años y por todos los momentos que hemos compartido. También a los miembros de la UAGI y al director de Fundación IVI, Nicolás Garrido, por su ayuda y apoyo a lo largo de este período de mi vida.

Y finalmente quiero agradecer a toda mi familia y amigos su confianza y apoyo. A Rafa, porque probablemente hoy no estaría aquí si no fuese por ti. Aunque la vida nos haya separado, has sido un pilar fundamental durante mucho tiempo. Has vivido a mi lado todos y cada uno de los disgustos, dificultades y complicaciones que he tenido a lo largo de estos cuatro años. Gracias por escucharme, por comprenderme, por apoyarme, por cuidarme, por darme la fuerza que necesitaba para seguir, por quererme. Gracias por ser como eres y por tu gran capacidad de ayudar a la gente. Esto no hubiese sido posible sin ti.

A mis amigos de Biotecnología Laura, Jorge, Álvaro, Laia, Fran, Rosa y Teresa. Porque, aunque ahora nos veamos poco, siempre recordaré todos los momentos de risas, de lobos, de juegos, de cenas.

A mis compañeros de teatro-musical, porque sin saberlo me habéis ayudado muchísimo este último año. A las “Anas” por todos los buenos momentos que hemos vivido juntas desde que decidí apuntarme al Camerino. Y en especial a Sergio, mi compañero de teatro y ahora compañero de vida. Gracias por todo. Por enseñarme que a veces las cosas que dan miedo son las que más cosas buenas te regalan. Porque me has dado la fuerza que necesitaba para decidir, para cambiar, para crecer. Gracias por alegrarme con tu talento y tu ingenio, por quererme y por cuidarme. Por ayudarme a encontrarme a mí misma y a llenar mi vida de cosas que siempre he querido hacer pero que por un motivo u otro han estado ausentes durante mucho tiempo.

A María y Pepe, por todo su cariño, apoyo y ayuda en estos últimos meses.

A Maru i a Paqui, per ser no sols durant aquests anys sinó durant tota la vida les meues segons mares. Perquè de vegades els llaços de sang no defineixen el vincle entre les persones. Y el nostre és el clar exemple. Sempre heu estat al meu costat, per a donar-me eixa abraçada quan més la necessitava, per a compartir somriures, plors i alegries, per a entendre'm quan quasi ningú ho feia. Gràcies per ser com sou.

Al meu germà, per la seua valentia i força, per el seu inconformisme. Perquè sempre seràs el millor model a seguir i la millor font d'inspiració per a continuar en aquest camí que és la vida.

A totes les meues cosines/cosins i ties/oncles. Perquè, malgrat no poder dedicar-vos a tots unes paraules, heu estat sempre al meu costat. Gracietes per tot. Sens dubte heu sigut, sou i sereu la millor família que haguera pogut tenir.

Als meus iaies, que malgrat no estar aquí han sigut un pilar fonamental en la meua vida. Allà on estigueu sempre vos portaré en el meu cor.

I per últim als meus pares, per el seu amor incondicional i la seva confiança. Perquè heu estat al meu costat en aquests anys i al llarg de tota la meua vida. Perquè sense vosaltres no seria qui soc, ni estaria avui aquí. VOS ESTIME MOLTÍSSIM.

GRACIAS A TODOS POR HACER ESTO POSIBLE

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, en los laboratorios de Fundación IVI, y en el Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia. Gracias a la ayuda PROMETEOII/2014/045 de la Generalitat Valenciana y a la ayuda FPU14/02999 del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

RESUM

L'envelliment, la baixa resposta ovàrica (PR) i altres condicions de dany, com és el cas dels tractaments oncològics, alteren la funció de l'ovari. No obstant això, inclòs quan l'ovari perd la seua capacitat d'ovular, romanen en ell fol·licles quiescents que poden ser rescatats per a créixer mitjançant distintes aproximacions. S'ha descrit la recuperació de la funció ovàrica després del trasplantament de medul·la òssia en pacients amb insuficiència ovàrica prematura (POI). Aquests casos suggereixen un possible efecte positiu de les cèl·lules mare de la medul·la òssia (BMDSC) en l'ovari. Partint d'aquesta idea, ens vam proposar avaluar si la infusió de BMDSC era capaç de rescatar els fol·licles dorments residuals i de regenerar el nínxol ovàric.

Amb aquest objectiu, en primer lloc, vam establir models murins de baixa reserva ovàrica (DOR)-PR i de POI mitjançant l'administració d'una dosi reduïda i d'una altra estàndard de quimioteràpia, respectivament. En aquests models de dany ovàric, vam estudiar l'efecte de la infusió de BMDSC humanes. Les cèl·lules mare van ser capaces de migrar i establir-se en el teixit ovàric danyat, augmentant el nombre de fol·licles preovulatoris, òvuls, embrions i cries sanes. A més, van millorar la vascularització ovàrica i la proliferació cel·lular, reduint l'apoptosi. Considerant les diferències estructurals i funcionals entre l'ovari murí i humà, a continuació vam validar els efectes regeneratius de les BMDSC en teixit humà. Per a això, vam utilitzar ratolins immunodeprimits ovariectomitzats als que se'ls va xenotrasplantar un fragment d'escorça ovàrica de pacients PR. Una vegada injectades, les BMDSC van ser capaces de migrar i establir-se en els implants ovàrics humans, localitzant-se prop de vasos sanguinis i de fol·licles, fins i tot en contacte amb cèl·lules de la granulosa. Van promoure el creixement fol·licular fins a estadi secundari, augmentant la secreció d'estradiol i millorant la vascularització local i la proliferació de l'estroma ovàric. Finalment, vam estudiar la rellevància dels mecanismes paracrins en els efectes regeneratius de les BMDSC en ovari. Amb aquesta finalitat, vam analitzar la correlació entre els nivells de determinats factors paracrins i l'increment dels marcadors de reserva ovàrica en pacients PR observat després de la infusió d'aquestes cèl·lules mare. Vam observar que la resposta positiva al tractament cel·lular es correlacionava positivament amb la presència en el plasma del factor de creixement fibroblàstic-2 i de la trombospodina-1.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquest treball suggereixen que les teràpies basades en BMDSC podrien ser una alternativa apropiada per a incrementar el potencial reproductiu de pacients d'edat reproductiva avançada, pacients PR i pacients POI en les que l'ovari no pot mantenir el creixement de la seua ja limitada reserva fol·licular.

RESUMEN

El envejecimiento, la baja respuesta ovárica (PR) y otras condiciones de daño como los tratamientos oncológicos alteran la función del ovario. Sin embargo, incluso cuando los ovarios pierden su capacidad de ovular, permanecen en él folículos quiescentes que pueden ser rescatados para crecer mediante distintas aproximaciones. Se ha descrito la recuperación de la función ovárica tras el trasplante de médula ósea en pacientes con insuficiencia ovárica prematura (POI) inducida por quimioterapia, sugiriendo un efecto positivo de las células madre de la médula ósea (BMDSC) en el nicho ovárico. En base a ello, nos propusimos evaluar si la infusión de BMDSC era capaz de rescatar los folículos durmientes residuales y de regenerar el nicho ovárico.

Con este objetivo, en primer lugar, establecimos modelos murinos de baja reserva ovárica (DOR)-PR y de POI mediante la administración de una dosis reducida y otra estándar de quimioterapia, respectivamente. En estos modelos de daño ovárico, evaluamos el efecto de la infusión de BMDSC humanas. Las células madre fueron capaces de migrar e infiltrarse en el tejido ovárico dañado, incrementando el número de folículos pre-ovulatorios, ovocitos, embriones y crías sanas. Además, mejoraron la vascularización ovárica y la proliferación celular, reduciendo la apoptosis. Considerando las diferencias estructurales y funcionales entre ovario murino y humano, nuestro segundo objetivo fue validar los efectos regenerativos de las BMDSC en tejido humano. Para ello, utilizamos ratones inmunodeprimidos ovariectomizados a los que se les xenotrasplantó un fragmento de corteza ovárica de mujeres PR. Tras su infusión, las BMDSC fueron capaces de migrar y establecerse en los implantes ováricos humanos, localizándose cerca de vasos sanguíneos y folículos, incluso en contacto con células de la granulosa. Promovieron el crecimiento folicular a estadio secundario, incrementando la secreción de estradiol y mejorando la vascularización local y la proliferación del estroma ovárico. Finalmente, evaluamos la relevancia del mecanismo paracrino en los efectos regenerativos de las BMDSC observados en ovario. Con tal fin, analizamos la correlación entre el incremento de los marcadores de reserva ovárica de pacientes PR tras la infusión de estas células madre y los niveles de determinados factores paracrinos. Observamos que la respuesta positiva a la terapia celular se correlacionaba positivamente con la presencia en el plasma del factor de crecimiento fibroblástico-2 y de la trombospodina-1.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las terapias basadas en BMDSC podrían ser una alternativa apropiada para incrementar el potencial reproductivo de pacientes de edad reproductiva avanzada, pacientes PR y pacientes POI en las que el ovario no puede mantener el crecimiento de su ya limitada reserva folicular.

ABSTRACT

Aging, poor ovarian response (PR) and other damaging-acquired conditions, like chemotherapy treatments, lead to an impaired ovarian function. Nevertheless, even when damaged ovaries lose their ability to ovulate contain remaining follicles that could be rescued to growth through different approaches. Spontaneous pregnancy has been achieved in women with premature ovarian insufficiency (POI) after bone marrow transplantation, suggesting a positive effect of bone marrow-derived stem cells (BMDSC) on the ovary. Therefore, we aimed to test if BMDSC infusion could supply the adequate ovarian niche to maintain and promote follicular growth.

To achieve this objective, mouse models of diminished ovarian reserve (DOR)-PR and POI were first established by a reduced or standard chemotherapy dosage, respectively. BMDSC infusion promoted follicular growth to the antral and pre-ovulatory stages and produced higher number of MII-oocytes and embryos in these established animal models. Furthermore, these stem cells allowed to achieve spontaneous pregnancies, increased litter size and induced ovarian niche regeneration, increasing microvessel density and proliferation and reducing apoptosis. Due to the structural and functional differences between mouse and human ovaries, then we validated in human tissue the observed BMDSC regenerative effects. To this end, immunodeficient mice xenografted with human ovarian cortex from PR patients were used. After their infusion, BMDSC were able to migrate and established within human ovarian grafts, mainly close to follicles and vessels. These stem cells promoted follicular growth to secondary stage, increased estradiol secretion, and enhanced ovarian stroma vascularization and proliferation. Finally, the relevance of the paracrine mechanism in BMDSC regenerative effects on the ovary was evaluated. For this purpose, we analyzed the correlation between the improvement in ovarian reserve biomarkers in PR after BMDSC infusion and the levels of different paracrine factors. A correlation between positive ovarian response to BMDSC infusion and fibroblast growth factor-2 and thrombospondin-1 levels was observed.

In conclusion, our results suggest that BMDSC-based therapies might be an alternative approach to improve follicular development and fertility potential in patients with impaired ovarian function.

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-Aminoactinomicina

AChE: Estradiol-acetilcolinesterasa

ACTB: Actina beta

AECs: Células madre epiteliales de membranas amnióticas, del inglés *Amniotic Epithelial Cells*

AFC: Recuento de folículos antrales, del inglés *Antral Follicular Count*

Akt: Proteína quinasa B

AMH: Hormona anti-mülleriana, del inglés *Anti-Müllerian Hormone*

AMSCs: Células mesenquimales aisladas de membranas amnióticas, del inglés *Amniotic Mesenchymal Stem Cells*

AR: Receptor de andrógenos, del inglés *Androgens Receptor*

ASCOT: Trasplante ovárico autólogo de células madre, del inglés *Autologous Stem Cell Ovarian Transplantation*

B2M: Beta 2 Microglobulina

BMDSC: Células madre mononucleares derivadas de la médula ósea, del inglés *Bone Marrow Derived Stem Cells*

BMP: Proteína morfogenética ósea, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*

BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés *Bovine Serum Albumin*

Bu: Busulfan

cDNA: ADN complementario, del inglés *Complementary DesoxyriboNucleic Acid*

CG: Células de la granulosa

CO: Corteza Ovárica

CPN: Péptido natriurético tipo C, del inglés *C-type Natriuretic Peptide*

Ct: ciclo umbral, del inglés *Cycle Threshold*

Cy: Ciclofosfamida

D: Diestro

D1, D2, ... D21: Día 1, día 2, ...día 21 tras la administración de quimioterapia o tras la infusión celular.

DAB: Diaminobencimida

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, del inglés *4',6-Diamidino-2-Phenylindol*

DDCt: Delta delta ciclo umbral, del inglés *Delta Delta Cycle Threshold*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico, del inglés *DeoxyriboNucleic Acid*

DOR: Reserva ovárica disminuida, del inglés *Diminished Ovarian Reserve*

DPBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco, del inglés *Dulbecco's phosphate buffer saline*

E: Estro

EOC: Hiperestimulación Ovárica Controlada con gonadotropinas

EPC: Células progenitoras endoteliales, del inglés *Endothelial Progenitor Cells*

ESCs: Células madre embrionarias, del inglés *Embryonic Stem Cells*

ESHRE: Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana, del inglés *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FBS: Suero Fetal Bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*

fc: Número de veces que se incrementa la expresión de un transcrito determinado respecto a su grupo control. Del inglés *Fold Change*

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2, del inglés *Fibroblast Growth Factor 2*

FIV: Fecundación *In Vitro*

FORKO: Modelo *knock-out* del receptor de folitropina

FSC: Señal de dispersión frontal de la luz láser, del inglés *Forward scatter*

FSH: Hormona folículoestimulante, del inglés *Follicle-Stimulating Hormone*

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, del inglés *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

GDF9: Factor de crecimiento y diferenciación 9, del inglés *Growth/Differentiation Factor 9*

GlcM: Cisteína-glutamato ligasa, del inglés *Glutamate-cysteine Ligase Catalytic Modifier*

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina, del inglés *Gonadotropin-Releasing Hormone*

H&E: Hematoxilina-eosina

hCG: Gonadotropina Coriónica humana, del inglés *human Chorionic Gonadotropin*

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*

HPRT1: hipoxantina fosforribosiltransferasa 1, del inglés *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

HSA: Albúmina sérica humana, *Human Serum Albumin*

HSC: Células madre hematopoyéticas, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*

IB4: Isolectina B4

ICSI: Inyección intracitoplasmática, del inglés *Intracytoplasmic Spem Injection*

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés *Insulin-like Growth factor 1*

IL-11: Interleuquina 11

IVA: Activación *in vitro*, del inglés *In Vitro Activation*

JAK1: Quinasa de Janus, del inglés *Janus Kinase 1*

KEGG: Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas, del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KL: Ligando kit, del inglés *Kit Ligand*

LH: Hormona luteinizante, del inglés *Luteinizing Hormone*

LOD: Límite de detección, del inglés *Limit Of Detection*

M: Metaestro

MII: Metafase II

Min: Minutos

MIRB: Ion Molday – Rodamina B, del inglés *Molday Ion Rhodamine B*

M-MLV: Enzima transcriptasa reversa obtenida del virus de la leucemia murina de Moloney

mRNA: ARN mensajero, del inglés *Messenger RiboNucleic Acid*

MSC: Células madre mesenquimales, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*

MVD: Densidad microvascular, del inglés *Microvessel Density*

N.S: Estadísticamente no significativo

O/N: Incubación a lo largo de la noche (aprox. 18 h), del inglés *Overnight*

P/S: Penicilina y estreptomicina

P: Proestro

PBMNC: Células mononucleares de sangre periférica, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffer Saline*

PC: Componente Principal, del inglés *Principal Component*

PCA: Análisis de Componentes Principales, del inglés *Principal Component Analysis*

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *Platelet Derived Growth Factor*

PDK1: Quinasa dependiente de fosfoinositol-1, del inglés *Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa, del inglés *Phosphatidyl Inositol-3-Kinase*

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, del inglés *Phosphatidyl Inositol-Bisphosphate*

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, del inglés *Phosphatidyl Inositol-Trisphosphate*

PMSG: Gonadotropina Coriónica Equina, del inglés *Pregnant mare's serum gonadotropin*

POF: Fallo ovárico precoz, del inglés *Premature Ovarian Failure*

POI: Insuficiencia ovárica prematura, del inglés *Premature Ovarian Insufficiency*

PR: Baja respondedora, del inglés *Poor Responder*

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, del inglés *Phosphatase and Tensin homolog*

RNA: Ácido ribonucleico, del inglés *RiboNucleic Acid*

RPLP0: Proteína ribosomal grande P0, del inglés *Ribosomal Protein Large P0*

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real, del inglés *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SWH: Vía de señalización intracelular Salvador/Warts/Hippo

TA: Temperatura ambiente

TBST: Tampón tris salino con tween, del inglés *Tris-Buffered saline Tween 20*

TdT: Enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal, del inglés *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta, del inglés *Transforming Growth Factor beta*.

THSP-1: Trombospondina 1, del inglés *Thrombospondin-1*

TIMP: inhibidor de metalopeptidasas, del inglés *Tissue Inhibitor of Metallopeptidases*

TMO: Trasplante de Médula Ósea

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha, del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*

TUNEL: del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

VCD: Diepóxido de 4-vinilciclohexeno

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

α -SMA: Actina alfa de músculo liso, del inglés *Alpha Smooth Muscle Actin*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL OVARIO	3
1.1. Función y unidades funcionales del ovario	3
1.2. Estructura histológica del ovario	5
1.3. Regulación de la foliculogénesis	6
1.3.1. Desarrollo folicular independiente de gonadotropinas: transición de folículo primordial a folículo primario.....	7
1.3.2. Transición de folículo primario-secundario a antral.....	9
1.3.3. Desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas	10
2. ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.....	11
2.1. Envejecimiento ovárico fisiológico	11
2.1.1. Biomarcadores de reserva ovárica.....	14
2.2. Alteraciones del proceso de envejecimiento ovárico fisiológico	14
2.2.1. Reserva ovárica disminuida	15
2.2.2. Baja respuesta ovárica	15
2.2.3. Insuficiencia ovárica prematura	15
2.3. Estrategias terapéuticas para recuperar o mejorar la función ovárica en pacientes DOR, PR o POI.....	17
2.3.1. Alternativas centradas en el régimen de EOC.....	17
2.3.2. Posibles estrategias para activar los folículos primordiales residuales: recuperación de la fertilidad mediante trasplante de médula ósea	18
3. CÉLULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA	27
3.1. Definición y tipos de células madre.....	27
3.2. Células madre adultas derivadas de la médula ósea	28

3.2.1. Movilización y aislamiento de las células madre de la médula ósea:	30
3.2.2. Ventajas de las BMDSC	32
3.2.3. Mecanismos de acción de las BMDSC	33
4. MODELOS ANIMALES DE ENVEJECIMIENTO OVÁRICO: DOR-PR Y POI	35
II. HIPÓTESIS	39
III. OBJETIVOS	43
1. Objetivo principal	45
2. Objetivos secundarios	45
IV. DISEÑO DEL ESTUDIO	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS	51
A) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI INDUCIDOS POR QUIMIOTERAPIA	53
1. Diseño experimental	54
2. Preparación del tratamiento quimioterapéutico	54
3. Estabulación y manejo de los animales	54
4. Daño ovárico inducido por quimioterapia: establecimiento de condiciones de DOR y POI	54
5. Estimulación ovárica controlada y cruce con machos fértiles	55
6. Monitorización del estado de salud, el peso corporal y el ciclo estral tras inducción DOR-POI	56
7. Sacrificio y obtención de muestras	58
8. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo	58
8.1. Análisis de la reserva folicular	58
8.1.1. Inclusión en parafina y cortes histológicos	58
8.1.2. Recuentos foliculares	59

8.2. Recuperación y análisis del número de ovocitos MII y embriones de 2 células	61
9. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo.....	62
10. Evaluación del estroma ovárico	63
10.1. Degeneración del estroma ovárico.....	63
10.2. Vascularización.....	63
10.3. Apoptosis.....	64
11. Análisis estadístico	66
B) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI.....	66
1. Diseño experimental	66
2. Movilización de las BMDSC a sangre periférica y recuperación mediante aféresis	67
3. Caracterización de las poblaciones celulares	68
4. Aislamiento de las BMDSC	68
5. Obtención de las PBMNC.....	70
6. Viabilidad y marcaje celular	70
6.1. Determinación de la viabilidad celular	70
6.2. Marcaje con MIRB	71
7. Estabulación y manejo de los animales	71
8. Experimentación animal	71
9. Sacrificio y obtención de muestras.....	72
10. Localización de las células inyectadas	73
11. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo.....	73
11.1. Recuentos foliculares y de cuerpos lúteos.....	73
11.2. Recuperación y análisis del número de ovocitos MII y embriones de 2 células	74
12. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo.....	74

13. Evaluación del estroma ovárico	75
13.1. Análisis de la vascularización mediante PCR cuantitativa a tiempo real ...	75
13.1.1. Extracción del mRNA.....	75
13.1.2. Síntesis del cDNA	76
13.1.3. PCR cuantitativa a tiempo real	76
13.2. Proliferación celular.....	77
14. Análisis estadístico	78
C) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN TEJIDO	
OVÁRICO HUMANO DE PACIENTES PR.....	78
1. Diseño experimental	78
2. Obtención de las BMDSC y de su fracción CD133+	80
3. Marcaje celular y determinación de la viabilidad	80
4. Obtención y procesamiento de las muestras de CO humana	81
5. Estabulación y manejo de los animales	82
6. Experimentación animal: xenotrasplante de CO humana e inyección celular.....	82
7. Sacrificio y obtención de muestras.....	83
8. Localización de las células madre tras su infusión.....	83
9. Presencia en la médula ósea de los animales de las células madre inyectadas	84
10. Análisis de las poblaciones foliculares	85
10.1. Recuentos foliculares	85
10.2. Activación folicular.....	85
11. Análisis del estroma ovárico	86
11.1. Evaluación histológica de la vasculatura en los implantes de CO.....	86
11.2. Análisis de la vascularización en los implantes de CO mediante RT-qPCR	
.....	87
11.3. Evaluación de la proliferación en los implantes de CO	87
12. Determinación de los niveles séricos de estradiol.....	88
13. Análisis transcriptómico mediante matrices basadas en RT-qPCR	89

13.1. Obtención de mRNA y síntesis del cDNA	89
13.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR	90
13.3. Normalización de los datos	92
13.4. Filtración de los datos de baja calidad	93
13.5. Análisis bioinformático	93
13.5.1. Análisis de Componentes Principales.....	93
13.5.2. Test de proporciones de Fischer	93
13.5.3. Análisis funcional	94
14. Análisis estadístico	94
D) MECANISMO PARACRINO EN LA REGENERACIÓN OVÁRICA	
INDUCIDA POR BMDSC	95
1. Diseño experimental	95
2. Movilización de las BMDSC, aféresis e infusión	95
3. Seguimiento de las pacientes	95
4. Cuantificación de los factores solubles secretados por las BMDSC en el plasma de la aféresis.....	96
4.1. Obtención del plasma.....	96
4.2. Análisis de KL, THSP-1, IGF-1, IL-11 y BMP-6 mediante ELISA	96
4.3. Análisis de FGF-2, PDGF-BB y TNF- α mediante ELISA multiplex.....	97
5. Análisis estadístico	99
VI. RESULTADOS	101
A) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI INDUCIDOS POR QUIMIOTERAPIA.....	103
1. Efectos sistémicos de la administración de quimioterapia: estado de salud general, peso corporal y tasa de supervivencia	103
2. Evaluación del tamaño y peso ovárico tras la estimulación.....	105
3. Efectos sobre el ciclo estral	105
4. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo.....	107

4.1. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular	107
4.2. Análisis de los ovocitos MII y de los embriones	108
5. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo.....	110
6. Alteraciones en el estroma ovárico y la apoptosis.....	110
B) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI.....	113
1. Caracterización de las poblaciones de BMDSC.....	113
2. Viabilidad y eficiencia del marcaje con MIRB	113
3. Monitorización del ciclo estral.....	114
4. Evaluación del peso, tamaño y estructura ovárica tras la estimulación.....	115
5. Migración e injerto de las células inyectadas	117
6. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo.....	119
6.1. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular	119
6.2. Análisis de los ovocitos MII y de los embriones.....	121
7. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo.....	122
8. Análisis de la vascularización del estroma ovárico murino.....	123
9. Estudio de la proliferación y de la apoptosis	125
C) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN TEJIDO OVÁRICO HUMANO DE PACIENTES PR.....	127
1. Viabilidad y eficiencia del marcaje con MIRB	127
2. Migración e injerto de las células madre en la CO humana.....	128
3. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular	129
4. Análisis de la vascularización en los implantes de CO	131
5. Análisis de la proliferación en los implantes de CO	133
6. Efectos de la infusión de células madre sobre la secreción de estradiol.....	134
7. Caracterización transcriptómica de los efectos inducidos por las células madre en tejido ovárico humano	134

D) MECANISMO PARACRINO EN LA REGENERACIÓN OVÁRICA INDUCIDA POR BMDSC	141
1. Caracterización de los factores solubles presentes en la aféresis y su influencia en el éxito de la terapia celular	141
VII. DISCUSIÓN	145
VIII. CONCLUSIONES	165
IX. BIBLIOGRAFÍA	169
X. ANEXOS.....	197

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Formación y evolución de la reserva ovárica.
- Figura 2. Foliculogénesis.
- Figura 3. Estructura del ovario.
- Figura 4. Esquema de las interacciones celulares propuestas en la transición de folículo primordial a primario.
- Figura 5. Papel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la regulación de la foliculogénesis.
- Figura 6. Mecanismos implicados en el envejecimiento.
- Figura 7. Declive en la reserva ovárica con la edad.
- Figura 8. Criterios diagnósticos de POI establecidos por la ESHRE.
- Figura 9. Efectos del envejecimiento ovárico en la reserva ovárica y los niveles de AMH.
- Figura 10. Embarazo espontáneo en paciente con POI inducida por tratamiento quimio- y radioterapéutico tras recibir un TMO.
- Figura 11. Clasificación de las células madre en función de su origen.
- Figura 12. Células madre presentes en la médula ósea.
- Figura 13. Esquema del proceso de aféresis.
- Figura 14. Efectos paracrinos y autocrinos de los factores solubles liberados por las células madre adultas en la reparación cardíaca.
- Figura 15. Consecuencias del tratamiento gonadotóxico sobre la capacidad reproductiva de mujeres en edad fértil.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 16. Diseño experimental del desarrollo y caracterización de modelos murinos de DOR y POI.
- Figura 17. Tipos de células presentes en los frotis vaginales en las distintas fases del ciclo estral.
- Figura 18. Clasificación folículos. Secciones histológicas con folículos de ratón en las diferentes fases del desarrollo folicular.
- Figura 19. Tipos de folículos morfológicamente anormales.
- Figura 20. Proceso de obtención de ovarios, ovocitos y embriones.
- Figura 21. Diseño experimental de la evaluación de los efectos regenerativos de las BMDSC en modelos animales de daño ovárico.
- Figura 22. Aislamiento de las BMDSC mediante centrifugación en gradiente de densidad.
- Figura 23. Cuerpos lúteos.
- Figura 24. Diseño experimental de la evaluación de los efectos regenerativos de las BMDSC en tejido ovárico humano.
- Figura 25. Esquema de un *RT² Profiler Array* (placa de 96 pocillos, formato C).
- Figura 26. Esquema de la tecnología Procartaplex (Affymetrix ebioscience).

RESULTADOS

- Figura 27. Efectos sistémicos de la administración de quimioterapia.
- Figura 28. Tamaño y peso ovárico en los modelos de daño ovárico.
- Figura 29. Monitorización del ciclo estral tras la administración de quimioterapia.
- Figura 30. Potencial reproductivo a corto plazo.
- Figura 31. Estructura del estroma ovárico en los modelos de daño ovárico.

- Figura 32. Análisis de la vascularización del estroma y de la apoptosis en los modelos de daño ovárico.
- Figura 33. Efectos de la infusión de BMDSC sobre el ciclo estral en los modelos de DOR y POI.
- Figura 34. Incremento del peso y tamaño ovárico tras la infusión de BMDSC.
- Figura 35. Presencia de las células inyectadas en el tejido ovárico.
- Figura 36. Rescate folicular tras la infusión de BMDSC.
- Figura 37. La infusión de BMDSC incrementó el número total de ovocitos MII y de embriones obtenidos tras la estimulación ovárica.
- Figura 38. Incremento del potencial reproductivo a largo plazo tras la infusión de BMDSC.
- Figura 39. Mejora de la vascularización del estroma ovárico murino tras la infusión de BMDSC.
- Figura 40. Incremento en la proliferación tras la administración de BMDSC.
- Figura 41. Reducción de la apoptosis tras la administración de BMDSC.
- Figura 42. Viabilidad celular y eficiencia del marcaje.
- Figura 43. Presencia de las células inyectadas en los implantes de corteza ovárica humana.
- Figura 44. Presencia de células inyectadas en otros órganos.
- Figura 45. La infusión de BMDSC promovió el crecimiento folicular a estadio secundario en tejido ovárico humano.
- Figura 46. Incremento en la vascularización de los implantes ováricos humanos tras la infusión de BMDSC.
- Figura 47. Las BMDSC incrementaron la proliferación en el estroma ovárico humano.
- Figura 48. Incremento en los niveles de estradiol tras la administración de BMDSC.

- Figura 49. Efectos transcriptómicos de las células madre en el tejido ovárico humano.
- Figura 50. Efectos de la infusión celular en los procesos de vascularización, proliferación y apoptosis.
- Figura 51. Factores y funciones reguladas por las células madre.
- Figura 52. Rutas KEGG enriquecidas tras la infusión de BMDSC y CD133.
- Figura 53. Relación entre los niveles de FGF-2 y THSP-1 y la respuesta positiva a la infusión de BMDSC.

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

- Tabla 1. Estudios que demuestran las propiedades regenerativas de distintos tipos de células madre en ovario de ratón o de rata dañado o envejecido.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Tabla 2. Protocolo de inclusión en parafina.
- Tabla 3. Genes incluidos en los *RT² Profiler Arrays* (placa 96 pocillos, formato C).
- Tabla 4. Límite de detección (LOD) y variaciones intra- e inter- ensayo de cada uno de los ensayos de ELISA realizados.

RESULTADOS

- Tabla 5. Potencial reproductivo durante 12 semanas.
- Tabla 6. Efectos de la infusión de BMDSC sobre el número de ovocitos y embriones obtenidos tras la estimulación ovárica.
- Tabla 7. Densidad folicular en los implantes de tejido ovárico humano.
- Tabla 8. Tabla de contingencia de la proporción de genes up- y down-regulados por los distintos tratamientos a los distintos tiempos de análisis.
- Tabla 9. Factores paracrinós presentes en la aféresis.
- Tabla 10. Concentración plasmática de los factores de crecimiento solubles estudiados en las pacientes con respuesta positiva a la infusión celular.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL OVARIO

1.1. Función y unidades funcionales del ovario

El ovario es un órgano multicompartimental en continuo cambio que tiene dos funciones principales:

- La generación de ovocitos competentes y fertilizables capaces de dar lugar a un embrión.
- La secreción de hormonas esteroideas necesarias para la preparación del tracto reproductivo para la fecundación y el embarazo, así como para otras funciones como el trofismo del sistema cardiovascular, sistema nervioso central y metabolismo óseo.

Para que estas funciones se lleven a cabo, deben darse una serie de eventos altamente coordinados y complejos conocidos como desarrollo folicular o foliculogénesis.

Los folículos son las unidades funcionales del ovario. Cada folículo consiste en un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas conocidas como células de la granulosa (CG), que nutren al ovocito en crecimiento a medida que los folículos maduran. El ovocito y las CG que lo envuelven están separados del tejido intersticial (estroma) por una membrana conocida como lámina basal. Los ovocitos se forman a partir de células germinales primordiales que migran del endodermo del saco vitelino hasta la cresta genital [1, 2] e inician un período de rápida mitosis para incrementar su número [3, 4]. Tras ello, algunas continúan dividiéndose, otras entran en muerte celular programada (apoptosis) y otras empiezan la meiosis, quedando detenidas en la fase de diploteno de la Meiosis y convirtiéndose en ovocitos primordiales [3, 4]. Los ovocitos primordiales permanecen detenidos en la Profase I hasta que se activa su crecimiento y maduración, proceso en el cual se convierten en haploides. Se encuentran rodeados por varias células somáticas aplanadas conocidas como pre-granulosa [5], formando los folículos primordiales (Figura 1). En humanos, el proceso de formación de los folículos primordiales tiene lugar durante la semana 15-20 de gestación [6], alcanzándose un pico de 6-7 millones en la semana 20. Tras ello, su número se reduce vía apoptosis, quedando ~ 400.000 folículos en cada ovario en el momento del nacimiento [7]. Una vez formado, este *pool* de folículos primordiales durmientes constituye la reserva ovárica, la cual es limitada y no renovable [7, 8].

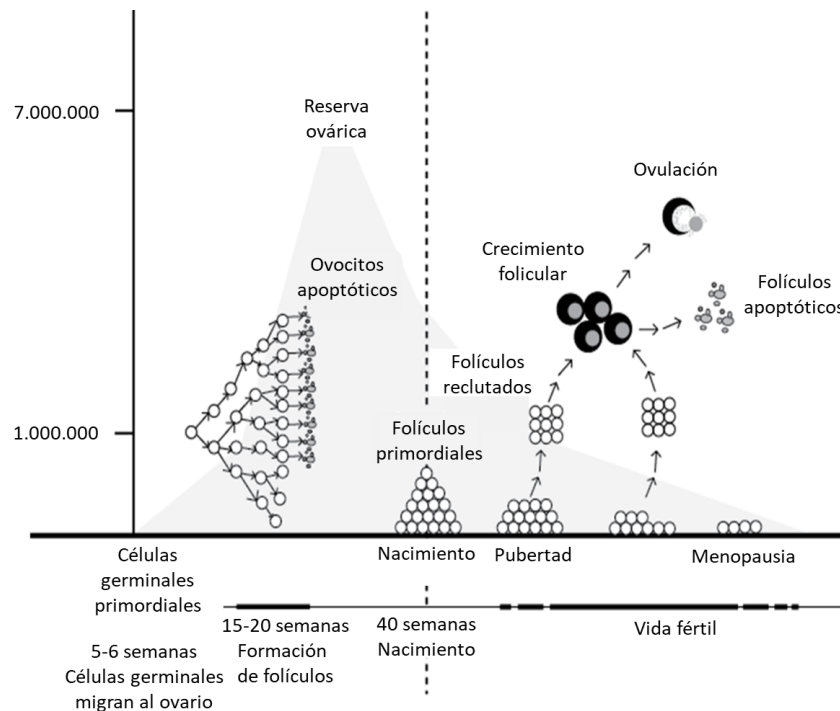


Figura 1. Formación y evolución de la reserva ovárica. En humanos, la reserva ovárica se forma durante la gestación, existiendo alrededor de 1 millón de folículos en el momento del nacimiento de los cuales solo unos 300.000 residen en el momento de la pubertad. Desde la pubertad hasta la menopausia este conjunto de folículos durmientes actúa como una fuente de folículos y ovocitos en desarrollo. Imagen modificada de Mcgee y Hsueh, 2000 [9].

Aunque teóricamente cada folículo primordial tiene la capacidad de crecer, madurar y ovular, en la realidad puede tener cuatro destinos [10, 11]:

- Permanecer en estado quiescente.
- Activarse, pero luego entrar en atresia.
- Activarse, desarrollarse, madurar y ovular.
- Morir directamente desde el estado quiescente.

Cuando un folículo primordial es activado, las CG empiezan a dividirse y cambian su morfología de aplanadas a cuboidales, pasando al estadio primario. Con la continua división de las CG, se alcanza el estado de folículo secundario o preantral en el que el ovocito se encuentra rodeado por varias capas de CG. A continuación, la acumulación de líquido folicular en la capa de granulosa forma la cavidad antral (o antro) característica de los folículos antrales y preovulatorios. Del conjunto de folículos reclutados en cada ciclo menstrual, solo uno de ellos consigue alcanzar el estado preovulatorio mientras que el resto entra en atresia (principalmente en el estadio antral). En respuesta a la oleada preovulatoria de gonadotropinas de cada ciclo, el folículo

preovulatorio dominante ovula y libera el ovocito maduro para la fecundación. El folículo residual sufre luteinización convirtiéndose en un cuerpo lúteo, que se encarga de la secreción de progesterona y, con ello, de la preparación del endometrio para la implantación en caso de que exista fecundación [10] (Figura 2).

En el estadio secundario, aparece alrededor de la granulosa una capa de células especializadas conocidas como células de la teca. Aunque aún no se sabe con exactitud, se piensa que estas células se originan a partir de células precursoras presentes en el estroma ovárico, que son reclutadas mediante factores secretados por los folículos primarios activados. Las células de la teca son esenciales para el crecimiento folicular, estableciendo un sistema vascular que permite la comunicación con el eje hipotálamo-hipofisario a lo largo del ciclo reproductivo, así como la liberación de nutrientes esenciales para este proceso [12].

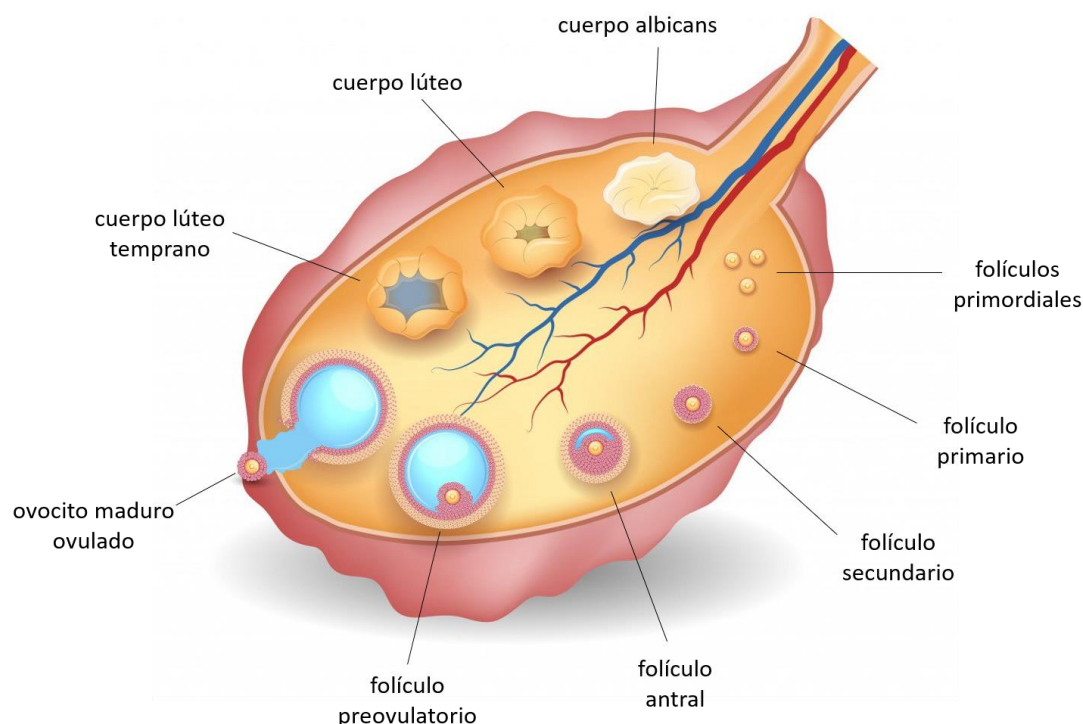


Figura 2. Foliculogénesis. Tras su activación, el folículo pasa por distintos estadios de crecimiento y maduración hasta que libera al ovocito, convirtiéndose en un cuerpo lúteo. Imagen modificada de la página web www.ivi-fertility.com.

1.2. Estructura histológica del ovario

Desde un punto de vista estructural, el ovario está dividido en tres zonas que son, de más externa a más interna (Figura 3):

- Epitelio.

- Corteza.
- Médula.

La corteza ovárica (CO) es rica en colágeno y, por ello, más rígida que la región medular interna [13, 14]. En su parte más externa se sitúan la mayoría de los folículos primordiales, mientras que los preantrales de mayor tamaño se sitúan comúnmente en la región medular. Esta distribución sistemática de los folículos a lo largo del gradiente de rigidez (o gradiente de colágeno) parece ser crítica para el mantenimiento de los ovocitos, el incremento de la supervivencia folicular y el desarrollo apropiado de la foliculogénesis [14].

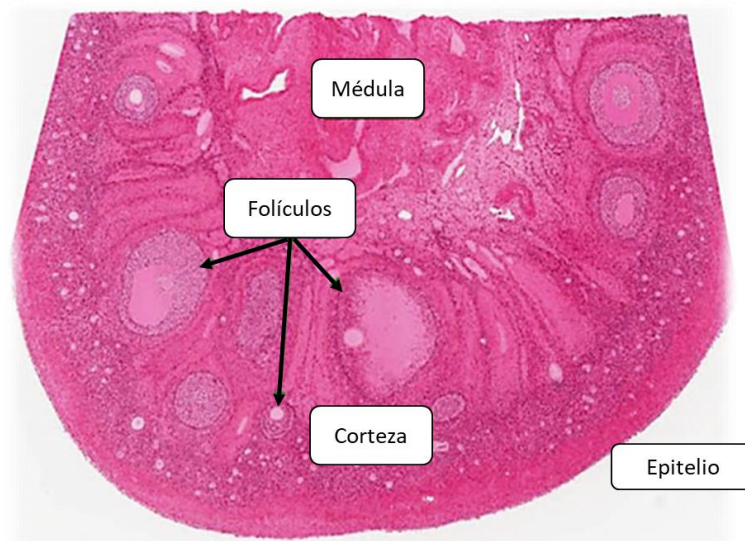


Figura 3. Estructura del ovario. Corte histológico de ovario humano en el que se pueden observar las tres partes estructurales del mismo: epitelio en la zona más superficial, seguido de estroma y médula en la parte más interna. Imagen modificada de la página web www.medcell.med.yale.edu.

1.3. Regulación de la foliculogénesis

El desarrollo folicular es un proceso secuencial de eventos altamente complejos, regulados de forma coordinada por factores de crecimiento, hormonas, receptores y enzimas [9, 15-17]. Dependiendo del requerimiento de gonadotropinas, el desarrollo folicular se clasifica en tres etapas [9]:

- Independiente de gonadotropinas: de estadio primordial a primario.
- Transición de folículo primario-secundario a antral.
- Dependiente de gonadotropinas: de folículo antral a preovulatorio.

Mientras que todos los eventos del crecimiento folicular dependiente de hormonas están bien caracterizados, poco se sabe acerca de los factores ováricos intrínsecos que regulan la activación y el desarrollo antes de que los folículos sean capaces de responder a las gonadotropinas [18].

1.3.1. Desarrollo folicular independiente de gonadotropinas: transición de folículo primordial a primario

Con la aparición de la menarquia, cada mes se activan aproximadamente 1.000 folículos primordiales que inician su crecimiento y maduración [19]. Pese a los avances realizados en las últimas décadas, en la actualidad aún se conoce poco acerca de los mecanismos que controlan la activación selectiva de dichos folículos. Esta falta de conocimiento se debe, principalmente, a que se trata de un proceso caracterizado por el crecimiento lento de un número sustancial de folículos pequeños durante un período prolongado de tiempo [9, 20], lo que dificulta mucho su estudio. Durante esta fase de la foliculogénesis el ovocito experimenta un gran crecimiento, así como un incremento sustancial en su metabolismo. En ratón, por ejemplo, la transición de folículo primordial durmiente a primario en crecimiento va acompañada de un aumento de 300 veces en el volumen del ovocito [21] y en el contenido de ácido ribonucleico (RNA, del inglés *RiboNucleic Acid*) [22], así como de un aumento de 38 veces en la tasa de síntesis de proteínas [23].

A pesar de que el mecanismo completo de activación folicular permanece sin descifrar, se han identificado distintas rutas de señalización, así como factores de crecimiento y neuropéptidos que juegan un papel importante en el control de este proceso. De todos ellos, la ruta señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)- proteína quinasa B (Akt) ha sido la más estudiada. Se trata de una ruta compuesta por quinasas, fosfatasa y factores de crecimiento que regula la proliferación celular, la supervivencia, la migración y el metabolismo. Gracias a su actividad quinasa, PI3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) generando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual actúa como segundo mensajero reclutando en el citoplasma a distintas proteínas con grupos de unión a lípidos, concretamente a la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1) y a Akt. PDK1 fosforila entonces a Akt activando su función. Una vez activo, Akt fosforila a Foxo3a provocando su exclusión nuclear (relocalización del núcleo al citoplasma) y su inactivación (inactivación por exclusión nuclear) [24]. Esta cascada de señalización se encuentra regulada negativamente por la

fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), una enzima fosfatasa que impide la acumulación de PIP3 y con ello la cascada de señales iniciada por el mismo. Se ha demostrado que en ovocitos la delección específica del gen *Pten* [18, 25], así como la del gen *Foxo3* [26], promueve la activación y crecimiento de todos los folículos primordiales. Además, se ha conseguido promover la activación de folículos primordiales empleando inhibidores de PTEN y/o activadores de PI3K, tanto en ovarios murinos como humanos [27, 28]. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de esta ruta en el control de la activación de los folículos durmientes.

En las últimas décadas se ha demostrado que distintos factores de crecimiento paracrinós y autocrinós son capaces de regular también el proceso de activación (Figura 4). Entre estos factores se encuentran:

- **Ligando kit (KL, del inglés *Kit Ligand*)**. Su neutralización bloquea la activación espontánea de los folículos primordiales, mientras que su adición reduce el número de esta población [29]. Al parecer, este factor sería producido principalmente por las CG y actuaría sobre el ovocito estimulando su activación y crecimiento [29, 30] a través de la ruta PI3K-Akt [18].
- **Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2, del inglés *Fibroblast Growth Factor 2*)**. Se expresa en estadios tempranos [31, 32], donde estimula la activación [31], la producción de estrógenos y la neoangiogénesis [33]. Se ha propuesto que este factor ejerce una regulación positiva indirecta del proceso de activación mediante el aumento de los niveles de KL [34].
- **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *Platelet Derived Growth Factor*)**. Este factor es capaz de activar *in vitro* la transición de primordial a primario [35]. Se ha descrito que es producido por los ovocitos y que podría actuar sobre las CG adyacentes estimulando la secreción de KL y, con ello, la activación de los folículos durmientes [35, 36].
- **Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *Insulin-like Growth Factor 1*)**. En fragmentos de CO humana en cultivo, el IGF-1 incrementa la transición de primordial a primario [37, 38]. Esto podría deberse a su capacidad de estimular la proliferación de la granulosa [39]. De hecho, se ha identificado la presencia del receptor de IFG-1 (IGFR-1) en el citoplasma de las CG de folículos preantrales pequeños (primordiales, primarios y secundarios tempranos) [38].

- **Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*).** Son factores de crecimiento de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *transforming growth factor beta*). De entre ellos, se ha descrito que el BMP-4 [40], el BMP-6, el BMP-7 [41, 42] y el BMP-15 [43] tendrían un papel en la regulación de la activación, diferenciación, crecimiento y función de las células foliculares.

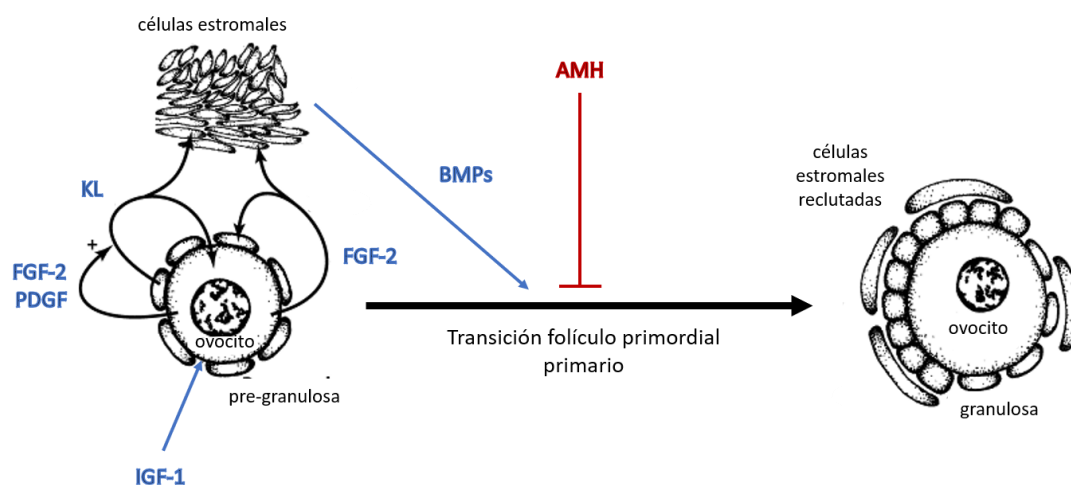


Figura 4. Esquema de las interacciones celulares propuestas en la transición de folículo primordial a primario. Estas interacciones están mediadas por distintos factores como son el ligando kit (KL), el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) la hormona anti-mülleriana (AMH) y distintas proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que actúan de forma paracrina o autocrina. Imagen modificada de Skinner *et al.*, 2005 [44].

Varios de estos factores juegan además un papel esencial en la formación de la capa de células de la teca. Concretamente, KL y FGF-2 estimulan el reclutamiento estromal de las células de la teca, mientras que KL e IGF favorecen su proliferación y diferenciación [12] (Figura 4).

1.3.2. Transición de folículo primario-secundario a antral

Alcanzado el estadio primario, el incremento en la producción de KL y de otros factores facilita el crecimiento de los folículos a través de mecanismos autocrinos y paracrinus. Así, por ejemplo, se sabe que el ovocito activado inicia la producción de proteínas de la superfamilia TGF- β , concretamente del factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9, del inglés *Growth/Differentiation Factor 9*) y de BMP-15, que estimulan la proliferación de la granulosa y, con ello, el paso a folículo secundario [45-47]. Por otro

lado, el folículo primario secreta R-espondina2, que también estimula la transición de primario a secundario [31, 48, 49]. Ya en el estadio secundario, el BMP-7 producido por las células de la teca [41, 50] y el GDF9 y el BMP15 producidos por el ovocito garantizan la supervivencia de la granulosa [45, 46]. Además, el péptido natriurético tipo C (CPN, del inglés *C-type Natriuretic Peptide*) producido por las CG y la R-espondina2 secretada por el ovocito actúan de forma paracrina promoviendo el crecimiento de los folículos secundarios [48, 51]. Durante esta fase de la foliculogénesis empieza a ser importante la interacción de los folículos ováricos con el eje hipotálamo-hipofisario. Concretamente, la activina producida por los folículos secundarios estimula la producción de hormona folículoestimulante (FSH, del inglés *Follicle-Stimulating Hormone*) en la hipófisis, la cual a su vez actúa en el ovario a través del receptor de FSH, favoreciendo el crecimiento folicular y la formación del antro [52].

1.3.3. Desarrollo folicular dependiente de gonadotropinas

A lo largo de esta etapa del desarrollo folicular el hipotálamo secreta de forma pulsátil hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, del inglés *Gonadotropin-Releasing Hormone*) que actúa sobre la hipófisis induciendo la secreción de FSH y hormona luteinizante (LH, del inglés *Luteinizing Hormone*). La FSH activa y promueve el crecimiento de los folículos antrales. Además, estimula la producción por parte de la granulosa de estradiol, el cual actúa de forma autocrina y paracrina favoreciendo la proliferación de estas células y la expresión del receptor de la LH [53]. En humanos, en cada ciclo uno de los folículos antrales en desarrollo incrementa su capacidad de respuesta al estradiol y provoca un descenso en la secreción de FSH [54, 55], lo que conduce a la atresia del resto de folículos antrales en crecimiento. De esta manera en cada ciclo de ovulación existe un solo folículo dominante [56]. Finalmente, en respuesta al estradiol secretado, se produce un pico en la secreción de LH por parte de la hipófisis, pico que desencadena la ovulación y provoca que el ovocito del folículo dominante complete la meiosis y genere un gameto haploide listo para la ovulación y la consiguiente fecundación [57] (Figura 5).

El proceso de foliculogénesis se produce cada mes y dura hasta que aparece la menopausia, momento en el que tiene lugar el agotamiento folicular al quedar menos de 1.000 folículos en el ovario [58].

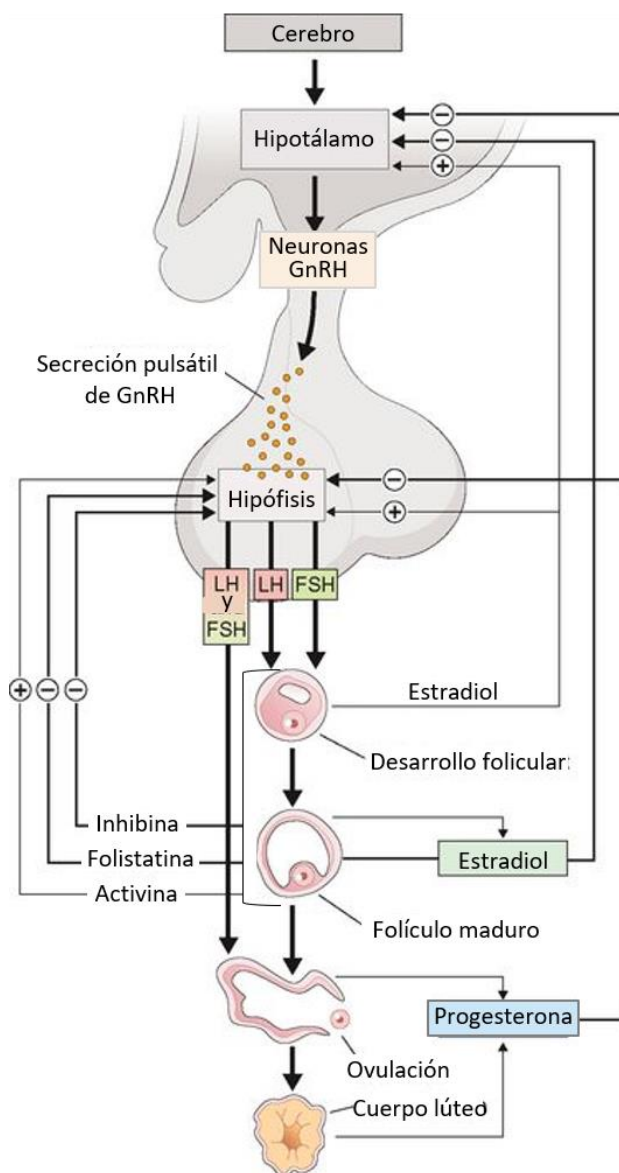


Figura 5. Papel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la regulación de la foliculogénesis. Las distintas hormonas secretadas por los folículos en desarrollo actúan sobre la hipófisis regulando la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, con ello de las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) por parte de la hipófisis. Éstas actúan a su vez sobre el ovario regulando el crecimiento y maduración folicular, así como desencadenando la ovulación. Imagen modificada de la página web www.phdnootrition.com.

2. ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

2.1. Envejecimiento ovárico fisiológico

El proceso de envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, que provoca una reducción funcional e incrementa la vulnerabilidad a la muerte. Este deterioro, es el principal factor de riesgo en la mayoría de las patologías humanas [59]. Se han propuesto nueve mecanismos celulares y moleculares que contribuyen y determinan el fenotipo de envejecimiento: inestabilidad genómica, atresia

telomérica, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre, y alteración de la comunicación intercelular [59] (Figura 6).

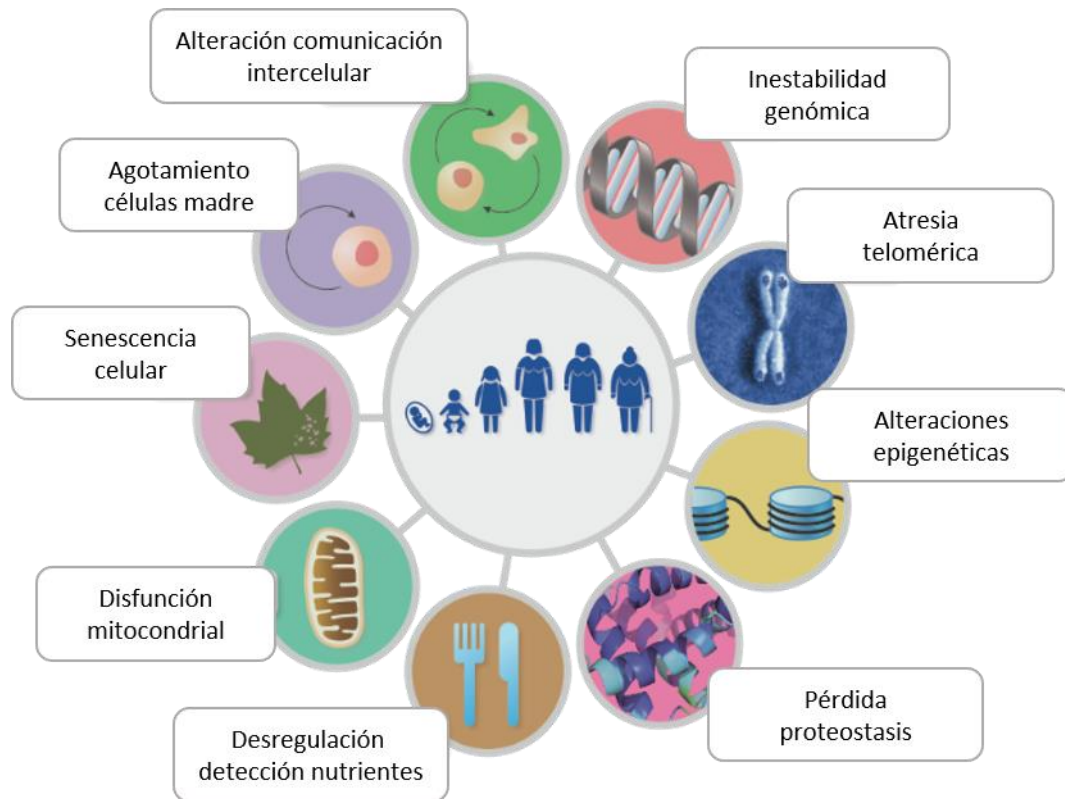


Figura 6. Mecanismos implicados en el envejecimiento. Se muestran los nueve mecanismos moleculares y celulares propuestos en 2013 por López-Otin como responsables del proceso de envejecimiento. Imagen modificada de López-Otin *et al.*, 2013 [59].

En el ovario, los primeros signos de envejecimiento aparecen relativamente pronto en comparación con otros órganos. De hecho, los ovarios experimentan un descenso en su funcionalidad en la treintena que deriva en un fallo ovárico completo durante las primeras fases del envejecimiento (40-50 años de edad), al diferenciarse el tejido ovárico funcional en tejido graso o fibroso [60]. Este desfase podría deberse a la elevada demanda de requerimientos fisiológicos necesaria para la función de los ovarios.

El envejecimiento ovárico está dominado por un descenso progresivo de la reserva ovárica [61]. Si bien la cantidad de folículos primordiales desciende gradualmente con la edad, el declive se incrementa considerablemente a medida que aumenta la edad de la mujer [7]. Este descenso va acompañado de una disminución en la calidad de los ovocitos (Figura 7). La pérdida de calidad ovocitaria podría ser explicada por el incremento de la no disyunción meiótica que se produce a medida que aumenta la edad

de la mujer, lo que supone una mayor tasa de aneuploidía en el embrión temprano [62-65]. Estas aneuploidías se relacionan entre otras causas moleculares con la incapacidad de los microtúbulos para ensamblar correctamente todos los cromosomas durante la formación del huso mitótico en ovocitos “viejos”. Este proceso de ensamblaje es una de las fases de la meiosis que requiere un mayor consumo de energía [66].

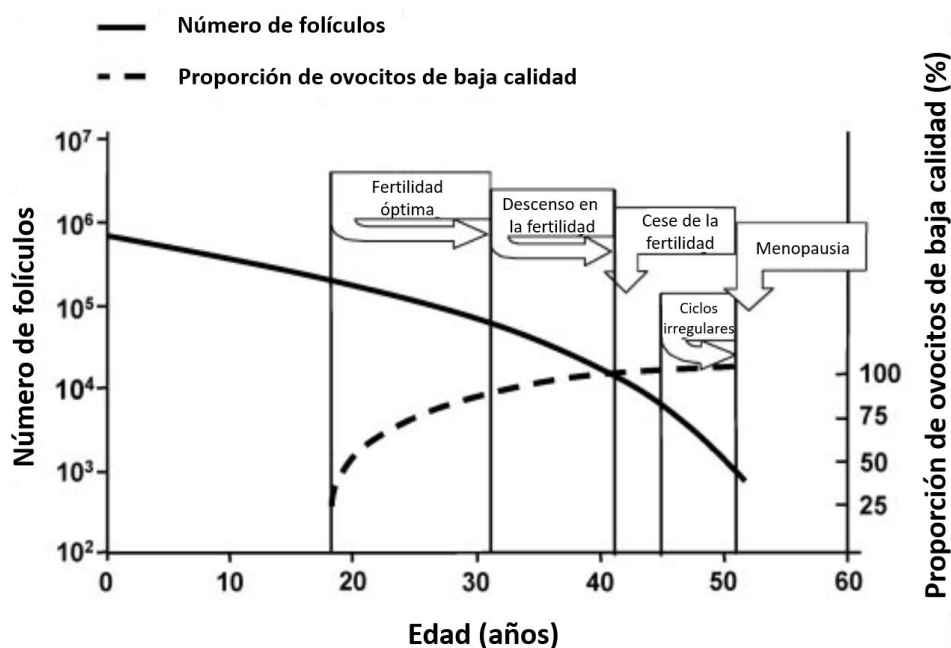


Figura 7. Declive en la reserva ovárica con la edad. El conjunto de folículos primordiales, que constituye la reserva ovárica, se va reduciendo progresivamente con la edad hasta que se alcanza la menopausia. El descenso en la cantidad de folículos va acompañado además de una reducción de la calidad ovocitaria. Imagen modificada de Broekmans *et al.*, 2009 [67].

Pese a los profundos cambios en la reserva ovárica durante la tercera y cuarta década de vida, el proceso de envejecimiento ovárico permanece en gran parte desapercibido. De hecho, es únicamente al final de éste cuando se producen eventos que son fáciles de percibir, como son las irregularidades en el ciclo menstrual y la menopausia. El primer signo clínico sutil del avance del proceso de envejecimiento ovárico es un acortamiento de 2-3 días en la duración del ciclo menstrual [68]. A medida que el envejecimiento ovárico avanza y la disponibilidad de folículos es insuficiente, se incrementa la frecuencia de retrasos menstruales, de períodos sin menstruación e incluso de intervalos prolongados de detención del ciclo. Esta fase del envejecimiento ovárico en la que ya se aprecian signos clínicos se conoce como transición menopáusica [69], se inicia como media a los 46 años de edad [68] y se extiende hasta el último período menstrual. El

último período menstrual o menopausia, solo puede reconocerse en retrospectiva y ocurre de media a los 51 años de edad [70].

2.1.1. Biomarcadores de reserva ovárica

Como ya se ha comentado, la pérdida continua de folículos solo se hace patente en los últimos estadios del envejecimiento ovárico. No obstante, existen ciertos marcadores/test que permiten estimar el estado de la reserva ovárica a lo largo del tiempo. Los métodos más comúnmente utilizados son:

- **Recuento de folículos antrales** (AFC, del inglés *Antral Follicular Count*). Se ha demostrado mediante estudios histológicos que el número de folículos antrales se correlaciona, a cualquier edad, con el número de primordiales existentes en el ovario en ese momento. Debido a ello, existe una fuerte correlación positiva entre el número de folículos antrales detectados mediante ecografía transvaginal y la reserva ovárica [67].
- **Niveles séricos de hormona anti-mülleriana** (AMH, del inglés *Anti-Müllerian Hormone*). Se trata de una glicoproteína producida principalmente por las CG de folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños. Aunque su acción principal es sobre el ovario, de forma autocrina y paracrina, también es detectable en el suero. Hoy en día se sabe que los folículos antrales pequeños son los que más contribuyen en los niveles séricos de esta hormona. Dada la relación directa de la reserva ovárica con el número de folículos antrales pequeños en el ovario, los niveles séricos de AMH disminuyen con la edad hasta llegar a ser indetectables cerca de la menopausia. A diferencia de otros marcadores de reserva ovárica, la determinación de AMH es independiente de la fase del ciclo menstrual [67].

Si bien existen otras pruebas que se emplean en la práctica clínica para determinar la reserva ovárica, como los niveles séricos de FSH y los niveles de inhibina B, se recomienda emplear una combinación de los dos marcadores arriba descritos: AFC y AMH [71, 72].

2.2. Alteraciones del proceso de envejecimiento ovárico fisiológico

Existen ciertas condiciones en las que el proceso de envejecimiento ovárico se ve alterado o acelerado.

2.2.1. Reserva ovárica disminuida

La reducción en la reserva ovárica con la edad avanzada de la mujer es un proceso fisiológico que da lugar a una condición conocida como reserva ovárica disminuida (DOR, del inglés *diminished ovarian reserve*). Sin embargo, algunas pacientes sufren DOR antes de lo normal, siendo infértiles de forma prematura. Esto es lo que se conoce como DOR patológica. Aunque no existe una definición comúnmente aceptada de DOR, en la práctica clínica se diagnostica a mujeres que presentan períodos menstruales regulares y valores anormales, pero no posmenopáusicos, en los marcadores de reserva ovárica [73]. Estas pacientes, suelen presentar una baja respuesta a los regímenes de estimulación ovárica. No obstante, aunque los resultados de los test de reserva ovárica de estas pacientes son buenos predictivos de su respuesta a los regímenes de estimulación, no lo son de la gestación [67]. De hecho, la calidad de los ovocitos y embriones de pacientes jóvenes, generalmente menores a 35 años, con DOR no se encuentra afectada [74, 75].

2.2.2. Baja respuesta ovárica

El término Baja Respondedora (PR, del inglés *Poor Responder*) se refiere a mujeres que, en el contexto de un tratamiento de reproducción asistida, tienen una respuesta insuficiente a la hiperestimulación ovárica controlada con gonadotropinas (EOC). Concretamente, las pacientes PR se caracterizan por cumplir al menos dos de los siguientes criterios:

- Edad igual o superior a 40 años u otro factor de riesgo de baja respuesta.
- Una cancelación previa o menos de 4 ovocitos recuperados tras estimulación con gonadotropinas.
- Resultado anormal en el test de reserva ovárica (por ejemplo: AFC menor de 5 o 7 folículos o AMH entre 0,5-1,1 ng/mL).

La incidencia de la baja respuesta ovárica en los tratamientos de Fecundación *In Vitro* (FIV) es de alrededor de un 10-25% [76].

2.2.3. Insuficiencia ovárica prematura

El caso más severo de alteración en el proceso de envejecimiento ovárico es la insuficiencia ovárica prematura (POI, del inglés *Premature Ovarian Insufficiency*). Las pacientes con esta condición se caracterizan por presentar antes de los 40 años niveles

posmenopáusicos de FSH (mayores a 25IU/L) y un mínimo de cuatro meses de oligo/amenorrea [77] (Figura 8).

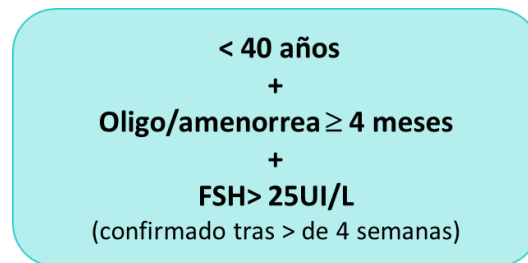


Figura 8. Criterios diagnósticos de POI establecidos por la ESHRE [77].

La condición de POI afecta aproximadamente a un 1% de las mujeres en la población general [78] y entre sus causas se incluyen anormalidades cromosómicas, enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos, infecciones, cirugías ováricas, y terapias oncológicas como las consistentes en altas dosis de quimioterapia [79] (Figura 9). Además, el POI tiene en ocasiones una base genética, existiendo más de 50 genes cuyas mutaciones pueden causar o influir en el desarrollo de esta condición [80]. No obstante, cabe destacar que en la actualidad el 90% de los casos de POI son de causa desconocida [81].

En cuanto a su pronóstico reproductivo, se estima que el 4,4% de las pacientes con POI podrá concebir de forma espontánea debido a una actividad ovárica residual [82]. El resto pueden optar a un tratamiento de reproducción asistida, aunque en base a su extremadamente baja reserva ovárica, las perspectivas de éxito son muy bajas [83]. De hecho, para estas pacientes, la tasa de recién nacido vivo por ciclo iniciado varía entre un 6 y un 11%, porcentaje muy inferior al registrado para pacientes con reserva ovárica normal [84, 85].

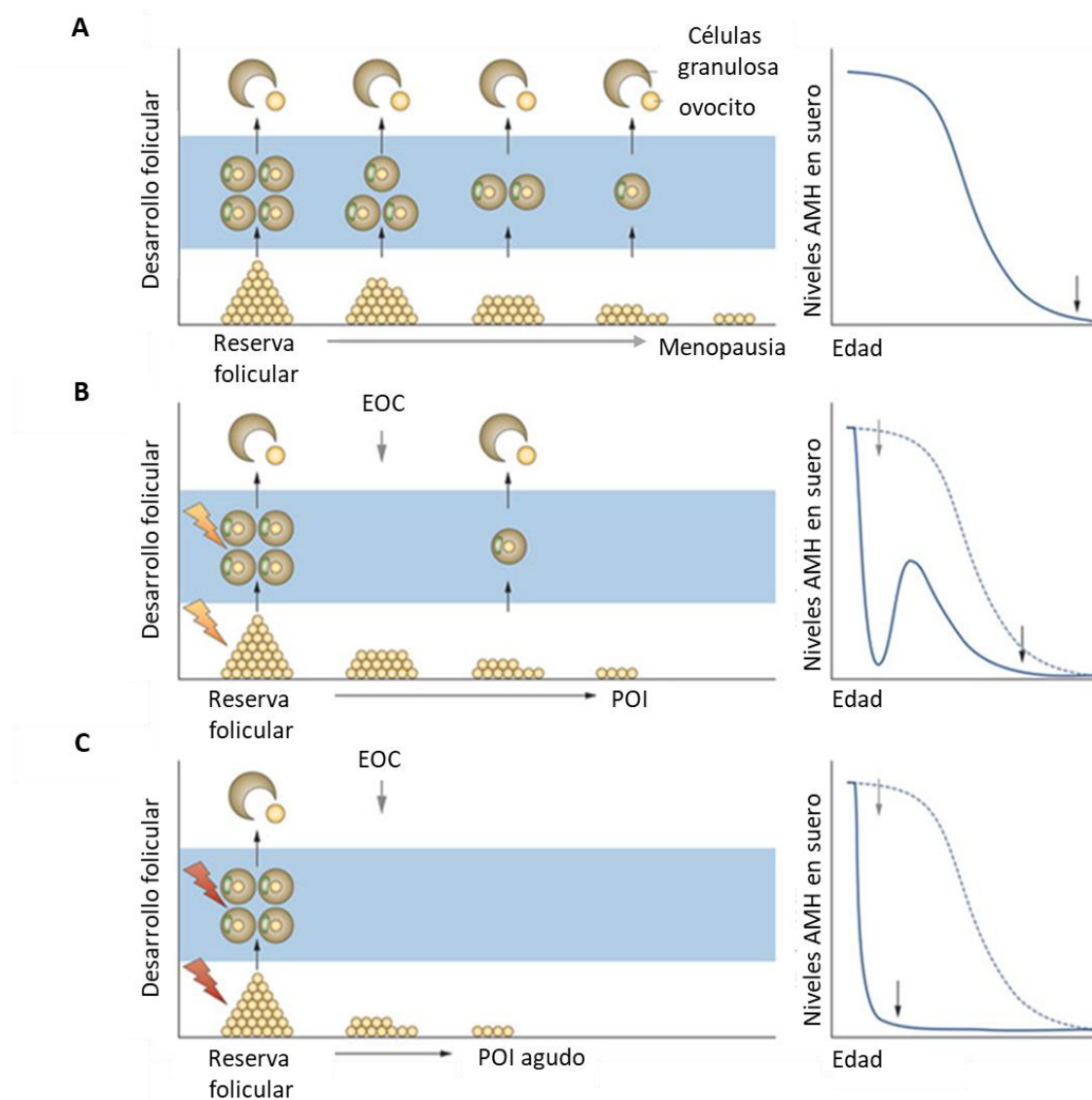


Figura 9. Efectos del envejecimiento ovárico en la reserva ovárica y los niveles de AMH. El panel superior representa el declive progresivo en el número de folículos y los niveles de hormona anti-müllerina (AMH) que se produce con la edad (envejecimiento ovárico fisiológico o normal). El segundo panel representa una función ovárica anormal, caracterizada por una reducción en el número de folículos antrales y los niveles de AMH antes de lo habitual. Esta situación se asemeja a la observada en pacientes con reserva ovárica disminuida (DOR). Finalmente, el tercer panel representa el proceso en pacientes con insuficiencia ovárica prematura (POI) donde no se producen folículos antrales y los niveles de AMH son casi indetectables. Esto puede deberse a muchas causas, entre ellas el tratamiento con quimioterapia. En todos los casos, cuando se pierde la función ovárica, quedan folículos primordiales residuales. EOC: estimulación ovárica controlada. Imagen modificada de Visser *et al.*, 2012 [86].

2.3. Estrategias terapéuticas para recuperar o mejorar la función ovárica en pacientes DOR, PR o POI

2.3.1. Alternativas centradas en el régimen de EOC

En los últimos años, la incidencia de DOR/PR y POI se ha incrementado en nuestra sociedad debido al retraso de la edad de la maternidad [87] y al aumento de la

supervivencia frente al cáncer [88, 89], respectivamente. Estas pacientes siguen representando un reto clínico pues, a pesar de que se han valorado múltiples intervenciones terapéuticas dirigidas a disminuir la incidencia de su baja respuesta, hasta la fecha todas tienen una eficacia limitada y poco reproducible [90]. Entre estas intervenciones se encuentran el aumento de la dosis de FSH, uso de FSH recombinante, administración de FSH en fase lútea, modificaciones en los protocolos de desensibilización hipofisaria, pretratamiento con estrógenos o anticonceptivos orales combinados y el pretratamiento con andrógenos. La mayoría de estas intervenciones se centran en el régimen de EOC. No obstante, puesto que estas pacientes no tienen folículos antrales susceptibles de ser estimulados con gonadotropinas o tienen un número muy reducido, su eficacia es muy limitada. Actualmente, la única solución práctica que se puede brindar a estas pacientes es la donación de ovocitos. Ésta puede ser aceptada o no en función de factores morales, éticos y religiosos. En cualquier caso, nunca es *a priori* lo deseable sino la opción menos mala, puesto que las alternativas son renunciar a la maternidad o aceptar la donación.

Por todo ello, hoy en día, existe la necesidad de desarrollar estrategias alternativas a la donación de ovocitos que permitan a estas pacientes conseguir su deseada maternidad. Estas estrategias deben centrarse, principalmente, en aumentar el número de folículos susceptibles de ser estimulados con gonadotropinas.

2.3.2. Posibles estrategias para activar los folículos primordiales residuales: recuperación de la fertilidad mediante trasplante de médula ósea.

Estudios recientes han demostrado que incluso cuando el ovario pierde su capacidad de ovular permanecen en él folículos primordiales residuales. Estos folículos residuales pueden ser rescatados para su crecimiento, dando lugar a ovocitos competentes y recién nacidos sanos, mediante la aplicación de distintas estrategias como son la activación *in vitro* y la fragmentación ovárica [91]. A más folículos activados, mayor cantidad de folículos antrales potencialmente estimulables y, por tanto, mayor cantidad de ovocitos maduros susceptibles de ser utilizados para generar embriones sanos. Este rescate de los folículos primordiales residuales podría ser el responsable de la recuperación de la fertilidad observada en pacientes oncológicas tras un trasplante de médula ósea (TMO). Hasta la fecha se han descrito distintos casos de embarazo espontáneo en pacientes con fallo ovárico inducido por tratamiento oncológico tras recibir un TMO [92-96]. Así, ya

en el año 1994 se reportó la recuperación espontánea de la menstruación en 6 pacientes con fallo ovárico tras recibir un único TMO autólogo. De ellas, 5 quedaron gestantes entre los 4 y los 40 meses tras el TMO, y tres de ellas dieron a luz a un bebé sano [92]. Posteriormente, Sanders y colaboradores publicaron un estudio en el que se recopilaba el seguimiento de un total de 708 mujeres post-puberales que habían recibido altas dosis de quimioterapia y un TMO para tratar anemia aplásica o malignidad hematológica. De ellas, 110 recuperaron una función ovárica normal y 32 quedaron gestantes. Concretamente, de las 103 pacientes tratadas con altas dosis de ciclofosfamida (Cy, 200 mg/kg) incluidas en este estudio, el 54% recuperaron la función ovárica tras el TMO, y un 24% se quedaron embarazadas de forma espontánea. Ambos parámetros fueron mucho menores en el grupo de pacientes tratadas con Cy (200 mg/kg) y busulfan (Bu, 16 mg/kg): de las 73 pacientes en cuestión, solo 1 recuperó la función ovárica tras el TMO, no registrándose ningún embarazo espontáneo [93]. En 2001, el grupo de Salooja recopiló resultados de un total de 139 mujeres que habían recibido quimioterapia y TMO autólogo (n=44) o alogénico (n=95). Entre las 44 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, se registraron un total de 35 nacidos vivos y entre las 95 pacientes que recibieron un trasplante alogénico, se obtuvieron un total de 78 recién nacidos vivos [94]. Del mismo modo, en 2002 Hershlag y colaboradores publicaron los resultados de la monitorización de 4 pacientes que tras recibir altas dosis de quimioterapia y TMO para tratar sus respectivas patologías tuvieron un embarazo espontáneo tras el TMO, si bien dos de ellas tuvieron que interrumpirlo por los posibles efectos adversos/teratogénicos del tamoxifeno [95]. Finalmente, en 2007, Veitia y colaboradores publicaron el caso de una paciente que tras recibir altas dosis de quimioterapia (concretamente de Cy), radioterapia y posterior TMO alogénico para tratar Anemia de Falconi, sufrió amenorrea durante 6 años y recuperó espontáneamente la fertilidad, dando a luz a un bebé sano años después del trasplante. El estudio genético demostró que el bebé derivaba de los folículos de la madre y no tenía relación genética con el donante de médula [96] (Figura 10).

Estos efectos beneficiosos del TMO en el ovario podrían deberse a las células madre presentes en la médula ósea. De hecho, se ha descrito que el nicho ovárico es capaz de atraer células madre indiferenciadas de otros órganos, específicamente de la médula ósea, en un proceso conocido como *homing* [97]. La hipótesis de que las células madre serían las responsables de los efectos positivos del TMO es, además, respaldada por estudios previos que han demostrado que una población específica de estas células, las

CD133+ (células progenitoras hematopoyéticas más inmaduras), posee propiedades regenerativas en el endometrio, promoviendo la proliferación celular y la neoangiogénesis [98, 99]. Por otro lado, en la última década se han llevado a cabo numerosos estudios que demuestran que la infusión de células madre de diferentes orígenes (tejido adiposo, menstrual, médula ósea, cordón umbilical, amnios) es capaz de restaurar la función ovárica en modelos animales de fallo ovárico [97, 100-120] (Tabla 1).

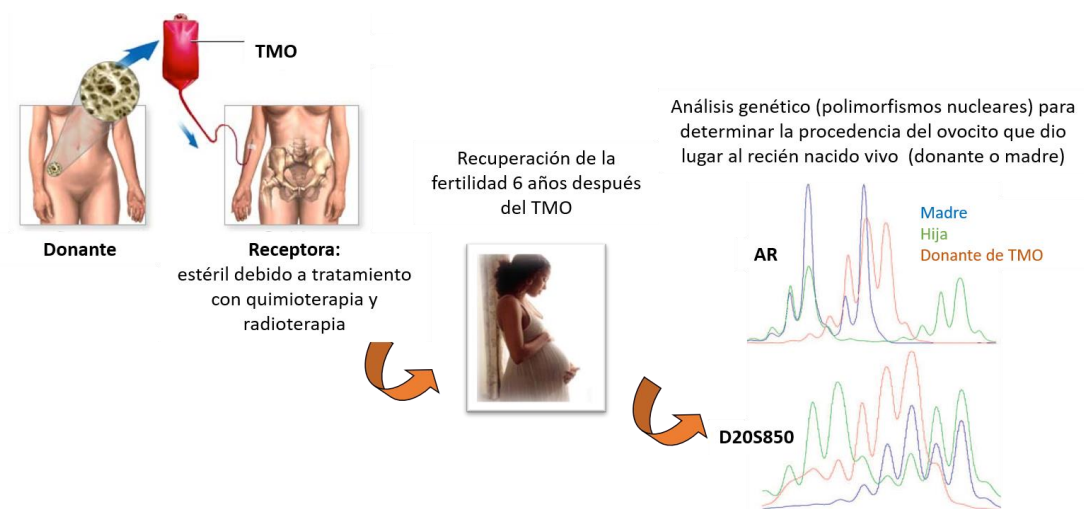


Figura 10. Embarazo espontáneo en paciente con POI inducida por tratamiento quimio- y radioterapéutico tras recibir un TMO. A la derecha se observa el resultado del análisis genético (de polimorfismos en el DNA) realizado a la receptora del trasplante de médula ósea (TMO) con una condición de insuficiencia ovárica prematura (POI) debido a un tratamiento previo con quimio- y radioterapia (madre), al recién nacido vivo (hija) y a la donante de la médula ósea. Se evaluaron distintos microsatélites, mostrándose el resultado de los dos más informativos: la repetición de trinucleótido en el receptor de andrógenos (AR) y el D20S850. Se puede observar que la hija presentaba polimorfismos comunes a la madre, pero no a la donante de médula ósea. Imagen modificada de Veitia *et al.*, 2007 [96].

En todos estos estudios las células madre empleadas fueron seleccionadas y /o cultivadas previamente a su empleo a fin de obtener un número suficientemente elevado para la terapia celular (Tabla 1). Esto supone una limitación en su traslación a humanos, pues el cultivo celular conlleva una acumulación de alteraciones genómicas y epigenómicas, así como la degeneración del potencial progenitor de las células madre [121]. Además, la ausencia de una fuente autóloga para muchos de los tipos celulares empleados en estos estudios (menstruales, amnióticas y de cordón umbilical) limita su aplicación terapéutica en pacientes añosas y/o pacientes POI. Ambas limitaciones podrían ser solventadas recurriendo al conjunto de células madre de la médula ósea.

Tabla 1. Estudios que demuestran las propiedades regenerativas de distintos tipos de células madre en ovario de ratón o de rata dañado o envejecido.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Fu X <i>et al.</i>, 2008 [100]	Modelo de daño ovárico en rata	Quimioterapia: Cy a 50 mg/kg el primer día y después a 8mg/kg durante 14 días consecutivos	Células madre mesenquimales de la médula ósea	Rata	Sí	2x10 ⁶ células, vía intraovárica	Recuperación de la ciclicidad estral, incremento en los niveles séricos de estradiol y descenso de los de FSH y reducción de la apoptosis	No
Ghadami M <i>et al.</i>, 2012 [101]	Modelo de POI en ratón	Modificación genética: <i>knock-out</i> del receptor de folitropina (FORKO)	Célula madre de la médula ósea	Ratón	No	2x10 ⁷ células a través de la vena de la cola	Restablecimiento de la foliculogénesis (incremento en el número de folículos maduros) y recuperación de la producción hormonal	Sí, mediante cruce con machos fértiles. El tratamiento con células madre no fue capaz de restablecer la ovulación, no obteniéndose ninguna gestación
Takehara Y <i>et al.</i>, 2013 [102]	Modelo de daño ovárico en rata y ratón	Quimioterapia: Cy tanto en rata como en ratón. En rata, a 50mg/kg el primer día y después a 8mg/kg durante 13 días consecutivos. En ratón, una única inyección de 200 mg/kg	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo	Rata y ratón	Si	2x10 ⁶ células, vía intraovárica	Aumento de la angiogénesis, así como del número de folículos en crecimiento y de cuerpos lúteos. Además, detectaron un incremento en los niveles de los factores paracinos HGF, IGF-1 y VEGF	Si, mediante cruces naturales sucesivos. La terapia celular incrementó el número de camadas obtenidas
Liu T <i>et al.</i>, 2013 [103]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, a 70 mg/kg. una única inyección	Células epiteliales sensibles a estrógenos derivadas de células madre pluripotentes inducidas	Humano	Si	1x10 ⁴ esferas celulares	Incremento en los niveles en plasma de estradiol y en el peso de los ovarios	No

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfan; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

Continuación Tabla 1.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Wang F <i>et al.</i>, 2013 [104]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Única inyección de 120 mg/kg de Cy y 30mg/kg de Bu	Células madre epiteliales de membranas amnióticas (AECs)	Humano	Si	2×10 ⁶ células a través de la vena de la cola	Recuperación de la producción hormonal, diferenciación en CG y restablecimiento de la foliculogénesis	No
Wang S <i>et al.</i>, 2013 [105]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, a 50 mg/kg durante 15 días consecutivos	Células madre mesenquimales de cordón umbilical	Humano	Si	1×10 ⁶ células a través de la vena de la cola	Aumento del peso ovárico y del número de folículos con ovocito en crecimiento, incremento en los niveles de estradiol y reducción de la apoptosis de la granulosa	No
Sun M <i>et al.</i>, 2013 [106]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, a 50 mg/kg durante 15 días consecutivos	Células madre derivadas de tejido adiposo	Ratón	Si	1×10 ⁶ células a través de la vena de la cola o 1×10 ⁵ vía intraovárica	Incremento del número de folículos en crecimiento y de la tasa de ovulación y reducción de la apoptosis	Solo datos de número de MII tras estimulación ovárica controlada (COS). La terapia celular incrementó la tasa de ovulación
Liu J <i>et al.</i>, 2014 [97]	Modelo de POI en rata	Quimioterapia: Cisplatina, a 2mg/kg durante 6 días consecutivos	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Rata	Si	4×10 ⁶ células a través de la vena de la cola	Incremento en el número de folículos antrales y en los niveles de estradiol	No

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfán; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

Continuación Tabla 1.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Xiao G <i>et al.</i>, 2014 [107]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Bu (20 mg/kg) + Cy (120mg/kg), una única inyección	Células madre de fluido amniótico de ratón	Ratón	Si	5×10 ⁵ células, vía intraovárica	Descenso en el número de folículos atresicos, incremento en el número de folículos sanos y mejora de la ciclicidad estral	Si, mediante varios cruces naturales. La terapia celular mejoró la tasa de gestación y el tamaño de las camadas
Liu T <i>et al.</i>, 2014 [108]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, a 70 mg/kg, una única inyección	Células madre menstruales	Humano	Si	1×10 ⁴ esferas celulares	Incremento en el peso ovárico, el número de folículos normales, los niveles de estradiol y AMH y la proliferación celular	No
Zhu S <i>et al.</i>, 2015 [109]	Modelo de daño ovárico en rata	Quimioterapia: Cy, a 50 mg/kg el primer día y después 8 mg/kg durante 14 días consecutivos	Células madre mesenquimales de cordón umbilical	Humano	Si	1×10 ⁶ células a través de la vena de la cola o vía intraovárica	Mejora de la ciclicidad estral y de los niveles hormonales	Si, mediante varios cruces naturales. La terapia celular supuso en algunos casos la recuperación de la fertilidad
Lai D <i>et al.</i>, 2015 [110]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Bu (30 mg/kg) + Cy (120mg/kg), una única inyección	Células madre mesenquimales endometriales	Humano	Si	2×10 ⁶ células a través de la vena de la cola	Incremento del peso corporal, el número de folículos y mejora de la ciclicidad estral	Si, mediante cruces naturales. La terapia celular mejoró la tasa de gestación y el tamaño de la camada

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfan; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

Continuación Tabla 1.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Su J <i>et al.</i> , 2016 [111]	Modelo de POI en rata	Administración de tripterygium glucósidos (extracto vegetal): 60 mg/kg/día durante 50 días vía intragástrica	Células madre derivadas de tejido adiposo	Rata	Sí	2×10 ⁶ células vía intraovárica (embebidas o no embebidas en una matriz de colágeno)	Recuperación de la ciclicidad estral, restablecimiento de los niveles de estradiol e incremento del número de folículos antrales y de la proliferación de las CG	Sí, mediante cruce con machos fértiles durante 10 días. La terapia celular incrementó la tasa de gestación
Elfayomy AK <i>et al.</i> , 2016 [112]	Modelo de POI en rata	Quimioterapia: Paclitaxel a 7,5 mg/kg (dosis única)	Células mesenquimales de cordón umbilical	Humano	Si	2×10 ⁶ células vía intraovárica	Recuperación de niveles hormonales normales, estabilización de la morfofostasis del epitelio superficial e incremento en el número de folículos antrales	No
Liu T <i>et al.</i> , 2016 [113]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, a 70 mg/kg, una única inyección	Células tipo granulosa derivadas de células madre pluripotentes inducidas	Humano	Si	50×10 ⁷ células	Presencia de folículos maduros, incremento del peso ovárico y de la secreción de estradiol y disminución del número de folículos atresicos	No
Song D <i>et al.</i> , 2016 [114]	Modelo de POI en rata	Quimioterapia: Cy, a 200 mg/kg el primer día y después 8mg/kg durante 15 días consecutivos	Células madre mesenquimales de cordón umbilical	Humano	Si	1×10 ⁵ células a través de la vena de la cola	Recuperación de los niveles hormonales normales, incremento en el número de folículos secundarios y reducción de la apoptosis	No

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfan; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

Continuación Tabla 1.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Ding C <i>et al.</i>, 2017 [115]	Diferentes grados de envejecimiento ovárico prematuro: desde DOR hasta POI establecido.	Quimioterapia: Cy a distintas dosis: -Baja: 70 mg/kg durante 2 semanas -Media: 70 mg/kg durante 1 semana y después 120 mg/kg durante otra semana -Alta: 120 mg/kg durante 2 semanas	AECs y células mesenquimales aisladas de membranas amnióticas (AMSCs)	Humano	Si	No especificada la dosis. Administración: a través de la vena de la cola	Recuperación de los niveles hormonales normales, del peso ovárico y del número de folículos en el modelo de POI. Los efectos de las AMSCs fueron mayores que las de las AECs	Si, mediante cruces naturales. La administración de AMSCs incrementó la tasa de gestación y el tamaño de las camadas
Wang Z <i>et al.</i>, 2017 [116]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cisplatina, a 2mg/kg durante 7 días consecutivos	Células madre menstruales	Humano	Si	1×10 ⁷ células inyectadas a través de la vena de la cola	Reducción de la apoptosis en las CG, incremento en el número de folículos (por reparación de los existentes) y restablecimiento de los niveles hormonales normales	No
Li J <i>et al.</i>, 2017 [117]	Modelo de perimenopausia en rata	Envejecimiento normal: se utilizaron ratas envejecidas (12-14 meses), confirmando la condición de perimenopausia mediante frotis vaginales	Células madre mesenquimales de cordón umbilical	Humano	Si	Dos inyecciones (separadas 48 horas) de 1×10 ⁶ de células a través de la vena de la cola	Restablecimiento de los niveles hormonales normales, mejora de la estructura ovárica, mayor número de folículos, incremento en los niveles de los factores paracrinicos HGF, IGF-1 y VEGF	No
Bao R <i>et al.</i>, 2017 [118]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Bu (20 mg/kg) + Cy (120mg/kg), una única inyección	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Ratón	Si	1×10 ⁵ células a través de la vena de la cola	Restablecimiento de los niveles hormonales normales, reducción de la apoptosis, incremento en la proliferación y mayor número de folículos sanos	No

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfan; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

Continuación Tabla 1.

Artículo científico	Modelo animal		Células madre				Efectos regenerativos en el ovario	Análisis del potencial reproductivo (descendencia)
	Tipo de modelo	Estrategia para inducir el daño ovárico	Tipo celular	Especie de origen	Cultivo previo al trasplante	Dosis y vía		
Badawy A <i>et al.</i>, 2017 [119]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Cy, una única inyección de 80 mg/kg	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Ratón	Sí	5x10 ⁵ células a través de la vena de la cola	Restablecimiento de los niveles hormonales normales	Sí, mediante cruces naturales. La terapia celular mejoró la tasa de gestación
Mohamed SA <i>et al.</i>, 2018 [120]	Modelo de POI en ratón	Quimioterapia: Bu (12 mg/kg) + Cy (70 mg/kg), una única inyección	Células madre mesenquimales de la médula ósea (comerciales)	Humano	Sí	5x10 ⁵ células vía intraovárica	Incremento del peso ovárico y de otros órganos estrógeno-dependientes (útero e hígado). Recuperación de la producción hormonal e incremento del número de folículos en crecimiento	Sí, mediante cruces naturales. La terapia celular mejoró la tasa de gestación

Se indica el tipo de modelo animal empleado, la procedencia, manejo e infusión de las células madre empleadas y los efectos regenerativos reportados (tanto a nivel del ovario como en cuanto a potencial reproductivo). Cy: Ciclofosfamida; Bu: Busulfán; CG: Células de la granulosa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento insulínico; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; AMH: hormona anti-mülleriana

3. CÉLULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA

3.1. Definición y tipos de células madre

Se entiende como célula madre a aquella célula indiferenciada con capacidad de autorrenovación clonogénica (capaz de dar lugar a clones idénticos) y de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares especializados (multipotencialidad) [122]. Estas propiedades de autorrenovación y multipotencialidad hacen de las células madre candidatos atractivos en la medicina regenerativa. De hecho, a día de hoy, la terapia con células madre es una alternativa prometedora en el tratamiento de muchas enfermedades, entre las que se encuentran la esclerosis múltiple y el infarto de miocardio [123].

Aunque las células madre pueden clasificarse de muchas maneras distintas (anatómicamente, funcionalmente, o mediante la expresión de marcadores de superficie), la forma más sencilla y común es la que las agrupa en función del sitio de origen. En función de este parámetro podemos encontrar los siguientes tipos de células madre [124] (Figura 11):

- **Células madre embrionarias** (ESCs, del inglés *Embryonic Stem Cells*). Son aquellas procedentes del embrión, concretamente, aisladas de la masa celular interna de blastocistos de entre día 3 y día 5. Se trata de células totipotentes, es decir, capaces de diferenciarse en células derivadas de cualquiera de las tres líneas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo. A pesar de su enorme potencial regenerativo, el uso de estas células es muy controvertido debido tanto a las cuestiones éticas derivadas de su origen en humanos como a su riesgo de transformación maligna (formación de teratomas y otros tumores) [124]. Por todo ello, quedan excluidas como población celular de interés en la terapia celular [5].
- **Células madre adultas.** También conocidas como células madre somáticas, son aquellas que se aíslan del individuo adulto. Las células madre adultas se encuentran localizadas en distintos tejidos, donde actúan como reservorio para reemplazar las células dañadas y/o senescentes. En comparación con las ESCs, tienen una menor capacidad de autorrenovación y son capaces de dar lugar a un número más reducido de tipos celulares. A pesar de ello, se han evaluado distintas poblaciones de células madre adultas como candidatas óptimas en la medicina regenerativa. Entre ellas, las más estudiadas han sido las células

madre de la médula ósea. Esto se debe, al menos en parte, a que la médula ósea es una fuente fácilmente accesible y disponible de células multipotentes [124].

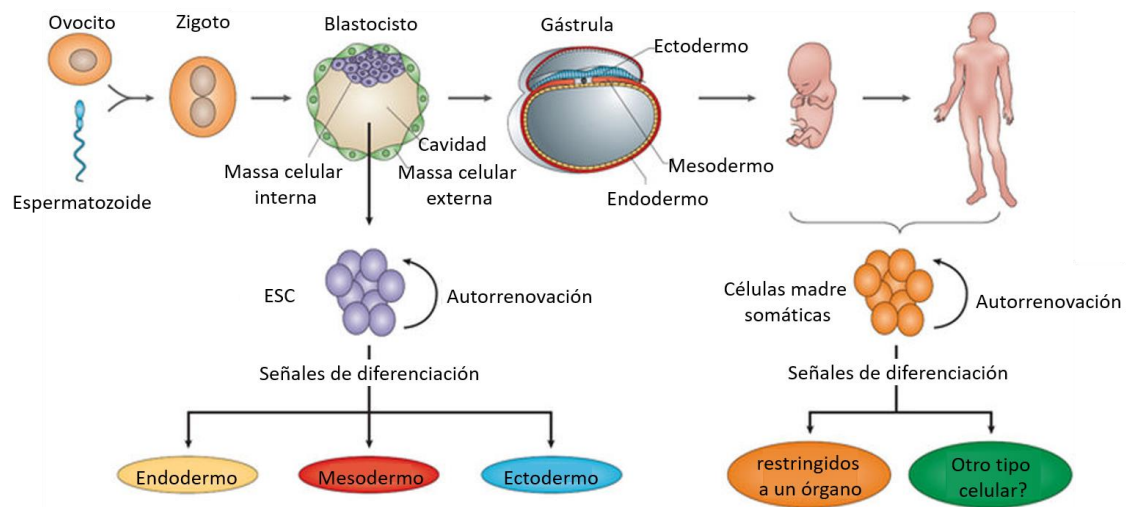


Figura 11. Clasificación de las células madre en función de su origen. En función del sitio de origen podemos distinguir entre células madre embrionarias (ESCs), que se aíslan del embrión y son capaces de diferenciarse en células de cualquiera de las tres líneas germinales, y células madre adultas, que se aíslan del individuo y poseen una menor capacidad de autorrenovación. Imagen modificada de la página web stemcells.nih.gov.

3.2. Células madre adultas derivadas de la médula ósea

La médula ósea está compuesta por una población heterogénea de células, así como por matriz extracelular, la cual contiene citoquinas y factores de crecimiento [125]. Entre las células de la médula ósea solo una pequeña proporción tienen características de célula madre [126]. Concretamente, la fracción celular de la médula ósea está formada por células diferenciadas (como monocitos, linfocitos, fibroblastos, adipocitos, condroblastos, osteoblastos y osteoclastos), así como por una fracción muy pequeña pero muy diversa de células indiferenciadas [124] (Figura 12). Dentro de esta pequeña fracción heterogénea de células indiferenciadas podemos distinguir entre:

- **Células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*).** Representan aproximadamente 1 de cada 10^4 células de la médula ósea de un adulto y son los hemangioblastos y las células progenitoras endoteliales (EPC, del inglés *Endothelial Progenitor Cells*) [126]. En humanos las HSC expresan los antígenos de superficie CD31, CD34, CD45, CD133, KDR y son linaje negativas y CD38 negativas [127-129]. Son capaces de dar lugar *in vitro* e *in vivo* a células endoteliales y a todos los tipos celulares del linaje hematopoyético [130].

Además, en determinados microambientes son capaces de transdiferenciarse en una amplia variedad de fenotipos entre los que se incluye músculo esquelético, neuronas, hepatocitos y cardiomiocitos [131-133]. Dentro de las HSC, las EPC son las que tienen un mayor papel en la angiogénesis de la médula debido a su gran potencial clonogénico [134]. Estas células son movilizadas a la sangre periférica, dando lugar a células endoteliales maduras que forman nuevos vasos tras un daño o en tumores [135]. De hecho, se ha propuesto que estas células representan un reservorio para la angiogénesis y vasculogénesis del cuerpo entero [136]. Los EPC serían pues células circulantes que promueven la neovascularización en los sitios de isquemia, hipoxia, daño y formación de tumor.

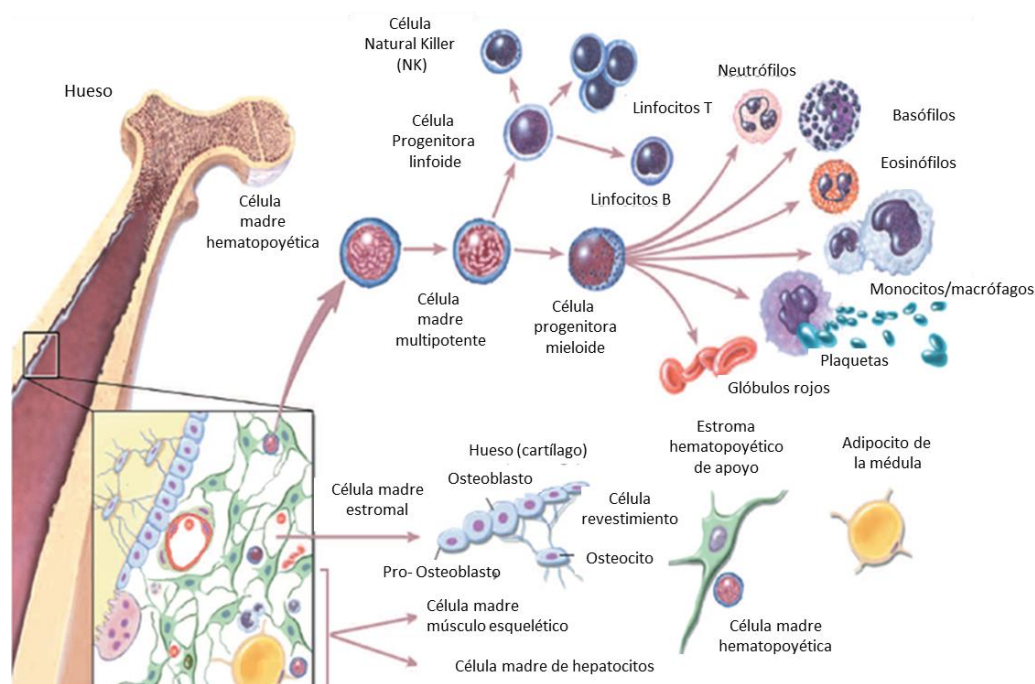


Figura 12. Células madre presentes en la médula ósea. Dentro de la médula ósea podemos distinguir dos grandes poblaciones de células madre: las células madre hematopoyéticas (HSC), que son capaces de dar lugar a todos los tipos celulares del linaje hematopoyético, y las células madre mesenquimales (MSC), que son capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos. Imagen modificada de Stemcells.nih.gov (© 2008 Terese Winslow).

- **Células madre mesenquimales** (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*). Representan 1 de cada 10^3 células de la médula ósea [126] y son capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos [137, 138]. Además, existen datos crecientes que soportan que los MSC podrían también diferenciarse en miocitos esqueléticos, cardiomiocitos y células endoteliales [139]. Se

caracterizan por su capacidad de adhesión al plástico en cultivo y por poseer principalmente los antígenos de superficie CD90 y CD105, siendo negativas para los marcadores del linaje hematopoyético [124].

3.2.1. Movilización y aislamiento de las células madre de la médula ósea

Durante muchas décadas, el único método conocido y empleado para trasplantar células madre de la médula ósea fue el trasplante directo de médula ósea TMO. Así, aunque éstas células madre están presentes también en sangre periférica [140], el número en el que pueden obtenerse de ella en condiciones basales es demasiado bajo, siendo además el número de células T contaminantes demasiado alto como para considerarla una fuente segura para el trasplante [141]. No obstante, actualmente es posible movilizar las células madre de la médula ósea a sangre periférica mediante distintos tratamientos, habiéndose convertido la sangre periférica movilizada en la fuente de elección para realizar los trasplantes autólogos. Esto se debe, entre otras razones, a la elevada producción de células inmaduras que se consigue con los tratamientos de movilización, el menor riesgo en la obtención, el considerable menor dolor para el paciente y las menores dificultades técnicas [142].

El tratamiento de movilización más comúnmente empleado en la práctica clínica consiste en la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*). Se trata de un factor de crecimiento hematopoyético que modula la hematopoyesis y el sistema inmune. Se utiliza ampliamente en la clínica para aumentar la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, y para activar funciones de neutrófilos [143]. Una vez movilizada, la fracción de células indiferenciadas de la médula ósea puede aislarse de sangre periférica mediante aféresis (Figura 13) y posterior centrifugación en gradiente de densidad [144]. El producto final de esta centrifugación se conoce como células madre mononucleares derivadas de la médula ósea (BMDSC, del inglés *Bone Marrow Derived Stem Cells*) y contiene HSC, MSC, así como células comprometidas con un linaje celular en distintos estados de maduración [124]. Así pues, las BMDSC son una población heterogénea de linfocitos, monocitos, células progenitoras endoteliales, HSC y MSC.

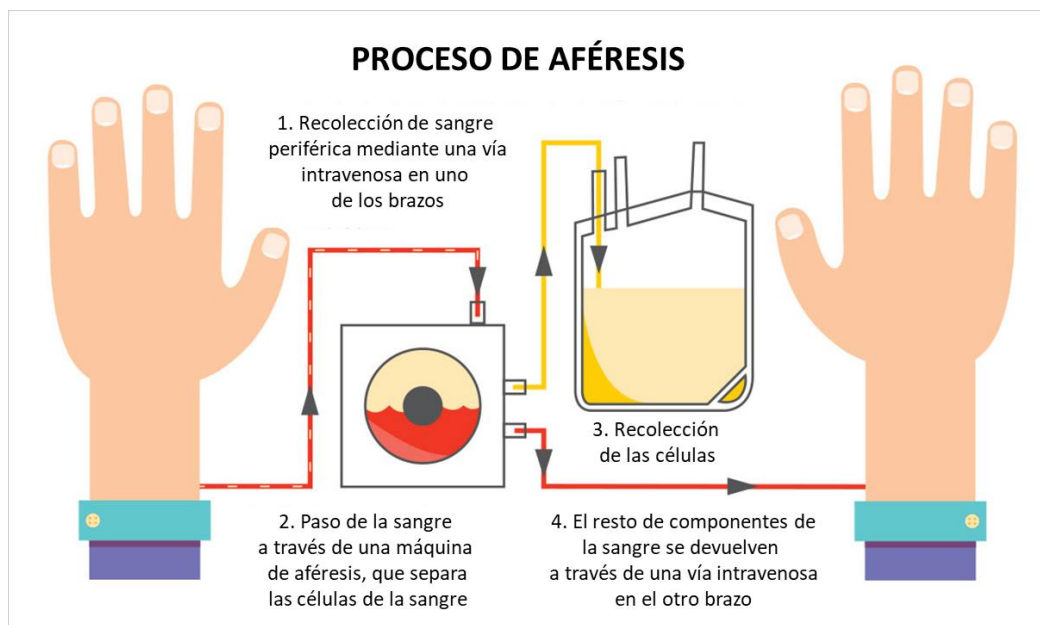


Figura 13. Esquema del proceso de aféresis. Se muestra de forma simplificada el proceso por el cual se obtienen mediante aféresis las células madre de la médula ósea movilizadas a sangre periférica. En este proceso se obtiene, mediante una vía intravenosa en uno de los brazos, sangre periférica. Esta sangre pasa a través de una máquina de aféresis que separa las células de los otros componentes de la sangre. Las células son recogidas en una bolsa, mientras que los componentes remanentes de la sangre vuelven al torrente sanguíneo del paciente a través de una vía intravenosa colocada en el otro brazo. Imagen modificada de la página web www.fbbb.org.

A partir de las BMDSC es posible aislar ciertas subpoblaciones de células madre para su aplicación en la clínica [145]. De entre los antígenos de superficie a emplear para su aislamiento los más ampliamente utilizados son el CD34 y el CD133 [146]. El antígeno CD34 se expresa tanto en las células HSC como en las células endoteliales y se utiliza comúnmente para identificar HSC [147]. De forma similar, el antígeno CD133 (prominina-1) es una glicoproteína de membrana expresada por las células madre hematopoyéticas inmaduras con una alta actividad proliferativa [148] y por células circulantes con capacidad de regeneración del endotelio (EPC) [149]. Esto hace que la población de células CD133+ sea de especial interés en el campo de la regeneración tisular y de la terapia celular. De hecho, se están llevando a cabo distintos ensayos clínicos para testar la seguridad y la viabilidad del uso de esta subpoblación en el tratamiento de distintas enfermedades humanas [99, 150, 151].

Aunque se han utilizado distintas subpoblaciones de BMDSC en terapia celular (células CD34+, células CD133+, MSC) [152], distintos autores resaltan su preferencia por la población entera, que contiene una composición fisiológica de células madre [153]. En cualquier caso, el producto de la terapia celular debe ser caracterizado al menos en cuanto a la expresión de los antígenos de superficie CD45, CD34 y CD133, pues

aunque las acciones regenerativas de las BMDSC no se relacionan estrictamente con estos marcadores, si representan marcadores ligados a una función regenerativa ya validada por datos publicados [146].

3.2.2. Ventajas de las BMDSC

En el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular las células madre de la médula ósea presentan ciertas ventajas que las hace ser de especial interés. En primer lugar, su seguridad ha sido testada, habiéndose registrado muchos datos que respaldan la seguridad de su trasplante o infusión en el tratamiento de distintas enfermedades [154, 155]. Este hecho facilita la rápida traslación de la técnica desde la investigación básica hasta los ensayos clínicos [153, 156]. Además, los hematólogos han acumulado décadas de experiencia clínica en el trasplante de BMDSC para el tratamiento de malignidades hematológicas. En segundo lugar, su facilidad de obtención ya sea en sangre periférica tras su movilización o mediante punción de la médula ósea, las hace una fuente de células madre autóloga, atractiva y éticamente robusta. En tercer lugar, estas células muestran tropismo por los tejidos/sitios dañados. Así, se ha demostrado que son capaces de hacer *homing* y de sobrevivir en los sitios donde existe un daño [157-161]. Por otro lado, su papel regenerativo ha sido previamente testado, existiendo muchos estudios que respaldan el papel regenerativo de estas células en distintas enfermedades y/o tejidos dañados. Este es el caso del infarto de miocardio [153, 156], la enfermedad de Huntington's [162], lesión de la médula espinal [163, 164], así como con el Síndrome de Asherman [98, 99]. Finalmente, a diferencia de lo que ocurre con otras células madre, como es el caso de las MSC de distintos orígenes, las BMDSC no requieren de un cultivo *ex vivo* para obtenerse en un número suficiente para la terapia celular. Esto supone una ventaja adicional, pues cualquier manipulación incrementa el riesgo de infección y de transformación [123].

3.2.3. Mecanismos de acción de las BMDSC

Se han propuesto distintos mecanismos por los que las células madre podrían ejercer sus efectos regenerativos en tejidos dañados o envejecidos. En lo que se refiere a las BMDSC, originalmente se propuso que los principales mecanismos que subyacían a su acción terapéutica eran la transdiferenciación en células propias del tejido y en células del linaje vascular [165-167]. Recientemente, se ha propuesto que la fusión de las células madre inyectadas con las células propias del tejido dañado (por ejemplo, cardiomiocitos) podría ser otro de los mecanismos que contribuye a los efectos

regenerativos de dichas células madre. No obstante, independientemente de si las células inyectadas se transdiferencian a través de un mecanismo dependiente o independiente de la fusión, en muchos estudios tanto la frecuencia de estas células en el tejido dañado como el número de células de nueva formación son demasiado bajos como para explicar la significativa mejora funcional observada tras la infusión. [98, 99, 168]. Por ello, distintos autores han propuesto que los beneficios funcionales observados tras la infusión de estas células madre podrían estar relacionados con la secreción de factores solubles que, actuando de forma paracrina, protegerían al tejido dañado, induciendo neovascularización y promoviendo la regeneración [168-170]. Cada vez existen más evidencias que respaldan la hipótesis de que los mecanismos paracrinicos juegan un papel esencial en el proceso de reparación observado tras la movilización y/o inyección de BMDSC. De hecho, se ha demostrado que las células madre adultas, especialmente las MSC, producen y secretan una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que podrían estar potencialmente implicados en el proceso de reparación y/o regeneración [171]. Así, por ejemplo, se ha observado que tras un infarto de corazón, el tratamiento con MSC o con BMDSC humanas incrementa significativamente las concentraciones tisulares del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), el FGF-2, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*), el IGF-1 y la adrenomedulina. Finalmente, la hipótesis del mecanismo paracrino está fuertemente respaldada por los estudios experimentales en los que se ha observado que la administración del medio condicionado de las células madre adultas recapitula los efectos beneficiosos obtenidos tras la terapia celular [110, 169, 170, 172].

Los factores paracrinicos pueden actuar sobre las células adyacentes y ejercer sus funciones de distintas maneras, siendo la neovascularización uno de los mecanismos más estudiados (Figura 14). Se ha demostrado que las BMDSC son capaces de expresar moléculas proangiogénicas [173]. Es por ello, que se ha hipotetizado que la liberación de factores proangiogénicos podría jugar un papel importante en la regeneración tisular, siendo la responsable del incremento en la densidad capilar observado en tejidos dañados tras la terapia celular. Así, por ejemplo, en corazones infartados la inyección de BMDSC incrementa la expresión de los factores angiogénicos FGF-2, VEGF y angiopoietina-1, así como de la interleuquina-1B y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*) [174]. La hipótesis de que la neovascularización observada tras la infusión de células madre está mediada por

factores paracrinos queda reforzada además por distintos estudios que reportan un aumento de la densidad microvascular mediante el empleo del medio condicionado de estas células madre [172]. También respaldan esta hipótesis aquellos estudios que evidencian que, aunque las BMDSC son capaces de incorporarse en estructuras vasculares, tras el tratamiento solo un pequeño número de vasos contienen células donantes. Así pues, la acción paracrina de las BMDSC explicaría principalmente la neovascularización observada tras la terapia celular, promoviendo los factores paracrinos la migración y proliferación de las células endoteliales y de las células vasculares de músculo liso, el alargamiento y maduración de los vasos y la síntesis de matriz extracelular.

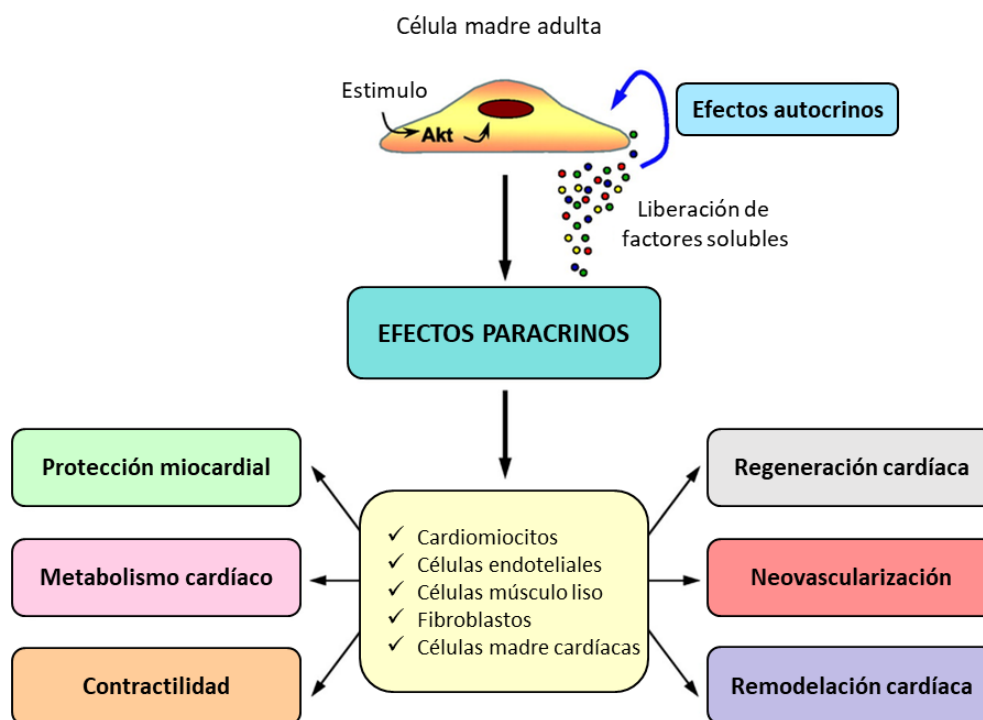


Figura 14. Efectos paracrinos y autocrinos de los factores solubles liberados por las células madre adultas en la reparación cardíaca. Las células madre adultas, una vez en el tejido cardíaco dañado, secretan moléculas que actúan de forma autocrina sobre las propias células madre o de forma paracrina sobre distintos tipos celulares presentes en el tejido cardíaco. Mediante este mecanismo paracrino, en el caso del corazón (tejido en el que más se ha estudiado el papel regenerativo de las células madre), promueven la protección miocárdial, el metabolismo cardíaco, la contractibilidad, la regeneración y remodelación cardíaca y la neovascularización. Imagen modificada de Gnechi *et al.*, 2008 [168].

En definitiva, hoy en día se sabe que en respuesta al daño tisular las células madre secretan factores solubles que actúan de forma paracrina promoviendo la supervivencia celular y la activación de mecanismos endógenos de regeneración y reparación. No

obstante, debe tenerse en cuenta, que los factores paracrinicos son liberados por las BMDSC en un momento y lugar determinado, causando diferentes efectos en función del microambiente existente tras el daño [168].

4. MODELOS ANIMALES DE ENVEJECIMIENTO OVÁRICO: DOR-PR Y POI

Si bien la infusión de BMDSC podría ser una estrategia terapéutica para solventar los problemas de fertilidad de pacientes con una condición de daño ovárico, la aplicación de cualquier nuevo tratamiento requiere del previo desarrollo y caracterización de modelos animales apropiados, reproducibles y económicos de estas condiciones en los que poder testarlos.

En la última década se han desarrollado diversos modelos murinos *knock-out* de envejecimiento reproductivo acelerado con un fenotipo comparable al de mujeres con POI [175-178]. No obstante, estos modelos presentan ciertas limitaciones. Así, en la mayoría de ellos los ovarios se encuentran dañados u afectados desde un momento muy temprano del desarrollo y no llegan a tener nunca sistemas reproductivos normales. Esto difiere de lo que ocurre en pacientes con DOR o POI, cuya función reproductiva suele ser normal en la juventud y el fenotipo de envejecimiento ovárico aparece en un momento más tardío de la vida (aunque de forma acelerada). Por otro lado, las hembras de estos modelos animales muestran alteraciones no solo en el ovario sino también a nivel uterino. Además, como todos los modelos *knock-out*, son modelos caros, difíciles de obtener y que requieren un genotipado continuo de la descendencia. Estas limitaciones explican que, en los últimos años, distintos grupos hayan recurrido a la gonadotoxicidad de los tratamientos quimioterapéuticos para desarrollar modelos animales de daño ovárico.

El tratamiento con dosis altas de quimioterapia puede producir efectos deletéreos sobre el ovario, destruyendo la dotación folicular y desembocando en POI y pérdida de la fertilidad [88, 89]. Clínicamente, el efecto de los tratamientos citotóxicos en el ovario va desde un daño parcial, que reduce la fertilidad, hasta una completa destrucción del *pool* folicular y atrofia tisular, llevando a una condición de POI y a la pérdida de fertilidad [179]. El grado de gonadotoxicidad varía entre los diferentes grupos de fármacos quimioterapéuticos. Concretamente, en mujeres los agentes alquilantes Cy, clorambucil, melfalán, Bu, gas nitrógeno y procarbazona son los que conllevan mayor riesgo de

insuficiencia ovárica, mientras que los compuestos basados en platino como la cisplatina conllevan un riesgo medio de POI [180]. El efecto del tratamiento quimioterapéutico en la función del ovario está relacionado con el declive en el número de folículos primordiales, así como con la reducción en el número de folículos en crecimiento [181]. De los agentes alquilantes, que como ya se ha comentado son los que causan con mayor frecuencia e intensidad daño ovárico e infertilidad [182, 183], el Bu y la Cy son los más habituales para el condicionamiento de las pacientes con enfermedades hematológicas que requieren un TMO [184].

Aunque los mecanismos por los cuales la quimioterapia daña al ovario no se conocen por completo, si se sabe que el daño en el DNA de las células foliculares [185, 186] y el daño en la microvasculatura ovárica juegan un papel importante [187]. La quimioterapia actúa sobre la reserva de folículos primordiales durmientes de forma directa (induciendo apoptosis en las células de la pre-granulosa y en ovocitos primordiales), así como mediante mecanismos indirectos (a través del daño en los folículos en crecimiento y en los componentes del estroma ovárico) [188, 189] (Figura 15). Las CG de los folículos preantrales grandes y de los folículos antrales pequeños son las primeras en degenerar tras la administración de Cy [190]. Esto se debe a que dichas células son las que poseen el índice mitótico más alto [190, 191] y a que la Cy tiene un mayor efecto en las células proliferativas [192, 193]. La pérdida de estos folículos en crecimiento supone la desaparición de la regulación negativa que ejercen éstos sobre la activación de los folículos primordiales, lo que deriva en una sobreactivación de los folículos durmientes (conocida como efecto *burnout*) y conduce al agotamiento de la reserva folicular [179]. Por otro lado, las células endoteliales proliferativas son también susceptibles al daño inducido por quimioterapia. Esto es relevante, pues la integridad y funcionalidad del ovario depende de una remodelación vascular cíclica que tiene lugar a lo largo del ciclo menstrual en mujeres o del ciclo estral en roedores [194]. De hecho, se ha descrito que en humanos la quimioterapia produce un daño en los vasos sanguíneos, con la consiguiente pérdida de los folículos presentes en el segmento suministrado por dichos vasos [187]. Además del daño en la vasculatura local, la administración de quimioterapia produce otros daños en el estroma ovárico, concretamente fibrosis cortical [187].

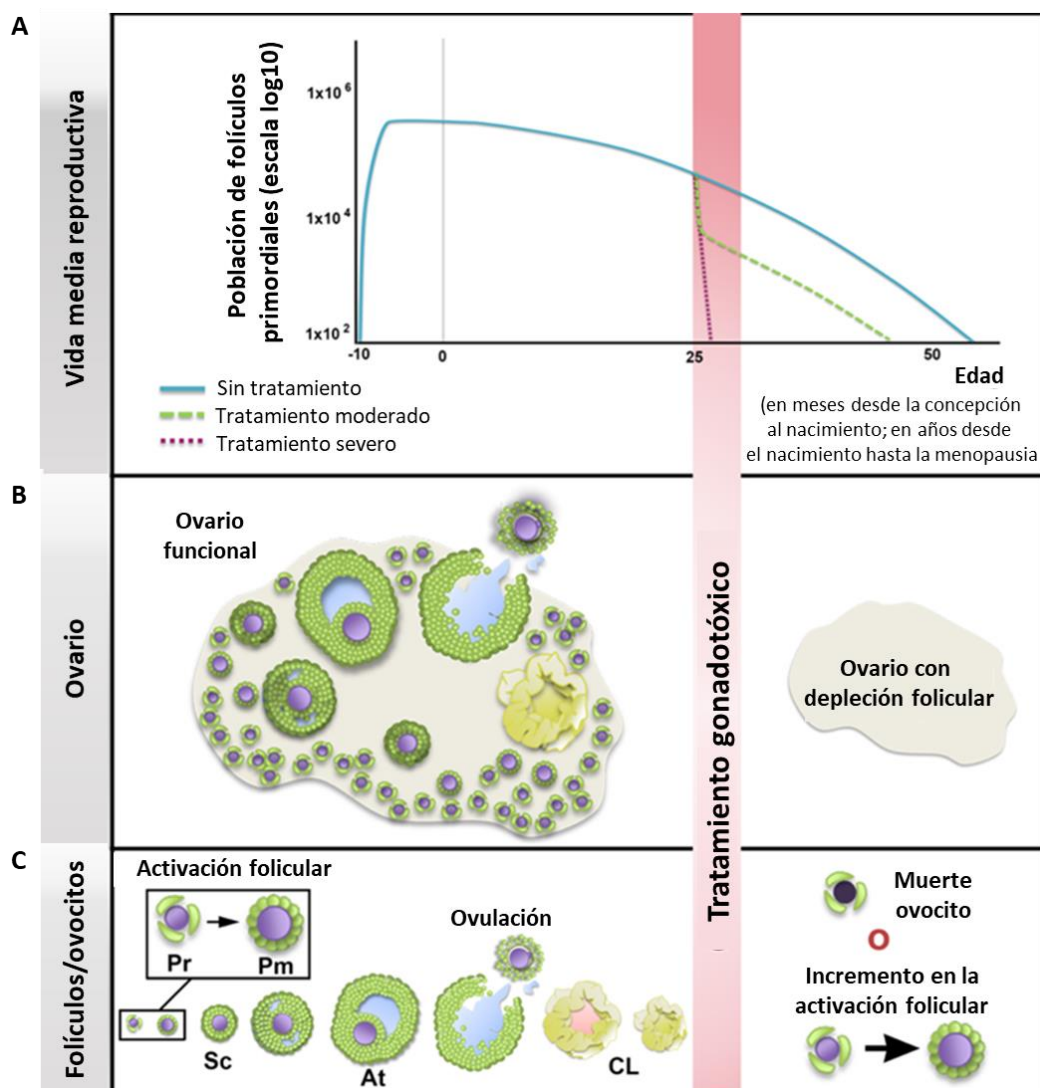


Figura 15. Consecuencias del tratamiento gonadotóxico sobre la capacidad reproductiva de mujeres en edad fértil. A) Declive fisiológico de la reserva ovárica con la edad de la mujer y patológico producido por el efecto gonadotóxico de la quimioterapia. El grado de gonatotoxicidad varía en función del o de los agentes quimioterapéuticos empleados. B) Esquema de un ovario control vs. un ovario tratado con quimioterapia. La quimioterapia produce una depleción folicular y conduce a un fallo ovárico, aunque quedan en el ovario un número reducido de folículos residuales durmientes. C) Mecanismos propuestos de daño folicular inducido por el tratamiento quimioterapéutico. Aunque se muestra el efecto sobre los folículos, la quimioterapia también actúa sobre el estroma ovárico, dañándolo y destruyendo la red vascular, lo que a su vez contribuye a la depleción folicular inducida. Pr: primordial; Pm: primario; Sc: secundario; At: antral; CL: cuerpo lúteo. Imagen modificada de Kim *et al.*, 2016 [196].

Debido a los efectos gonodotóxicos de la quimioterapia no es de extrañar que, en las últimas décadas, se hayan desarrollado distintos modelos de POI mediante la administración de agentes quimioterapéuticos [195]. No obstante, estos modelos no han sido completamente caracterizados. Además, hasta la fecha no se ha descrito ningún modelo animal de DOR. De ahí, la importancia de caracterizar totalmente los modelos ya existentes de POI inducida por quimioterapia y de desarrollar un modelo apropiado

de DOR que recapitule los fenotipos observados en las mujeres con esta condición menos severa de daño ovárico. Establecer estos modelos será esencial para el estudio de estrategias terapéuticas destinadas a incrementar el potencial reproductivo de pacientes con alteraciones ováricas.

II. HIPÓTESIS

La médula ósea contiene células madre con capacidad de migrar y establecerse en el tejido ovárico dañado, promoviendo el crecimiento folicular y la regeneración del estroma. Esto permitiría generar un nicho ovárico apropiado para la activación de los folículos primordiales residuales y el posterior mantenimiento de su crecimiento hasta estadios maduros. En base a ello, la infusión de BMDSC podría ser considerada una estrategia terapéutica adecuada para incrementar el potencial reproductivo de pacientes con DOR, PR y/o POI.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo principal

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es evaluar si la infusión de BMDSC humanas podría ser una alternativa terapéutica para conseguir la maternidad en pacientes que, debido a sus condiciones basales, al envejecimiento o a un previo tratamiento gonadotóxico, sufren DOR, PR o POI.

2. Objetivos secundarios

Para alcanzar este objetivo principal, el trabajo se dividió en cuatro bloques de estudio:

Estudio A. Desarrollo y caracterización de modelos animales de DOR-PR y POI inducidos por quimioterapia

Objetivos:

- Desarrollar y caracterizar un modelo murino de DOR-PR mediante la administración de quimioterapia, comparándolo con un modelo de POI previamente descrito en la literatura.
- Determinar si estos modelos de DOR y POI presentan un fenotipo comparable al de las pacientes con estas condiciones de daño ovárico y, en consecuencia, son apropiados para la evaluación de estrategias terapéuticas dirigidas a aumentar su potencial reproductivo.

Estudio B. Evaluación de los efectos regenerativos de la infusión de BMDSC humanas en los modelos murinos de DOR-PR y POI

Objetivos:

- Caracterizar las poblaciones celulares presentes en el conjunto heterogéneo de BMDSC humanas.
- Evaluar si estas células madre son capaces de anidarse en el tejido ovárico murino dañado por la quimioterapia.
- Analizar sus efectos sobre el potencial reproductivo a corto y a largo plazo, así como sobre el estroma ovárico.
- Corroborar que los efectos regenerativos de las BMDSC sean debidos a las células madre y no a las células mononucleares normalmente presentes en sangre periférica.

Estudio C. Análisis de los efectos regenerativos de la infusión de BMDSC humanas en tejido ovárico humano de pacientes PR

- Validar los efectos regenerativos de las BMDSC en tejido ovárico humano de pacientes PR xenotrasplantado en ratones.
- Testar si la fracción de células CD133+ es la principal responsable de los efectos de las BMDSC en el tejido ovárico humano.
- Dilucidar los mecanismos responsables de los efectos regenerativos de las BMDSC en el tejido ovárico humano.

Estudio D. Evaluación de la relevancia del mecanismo paracrino en la regeneración ovárica inducida por BMDSC

- Analizar si la presencia de determinados factores de crecimiento en el plasma de la aféresis influye en el éxito del trasplante autólogo de BMDSC en pacientes PR.

IV. DISEÑO DEL ESTUDIO

En primer lugar, se establecieron modelos murinos de DOR-PR y POI mediante la administración de una dosis reducida y otra estándar de quimioterapia, respectivamente. Ambos modelos se caracterizaron completamente, analizándose estado de salud general, peso, supervivencia, tamaño ovárico, potencial reproductivo a corto plazo (poblaciones/crecimiento folicular y número de ovocitos/embriones obtenidos tras estimulación ovárica), potencial reproductivo a largo plazo (tasa de gestación y tamaño de las camadas en cruces sucesivos) y estado del estroma ovárico. Una vez desarrollados los modelos murinos de DOR y POI, pasamos a evaluar si la infusión de BMDSC humanas era capaz de mejorar y/o recuperar la función ovárica de las hembras de estos modelos de daño ovárico, analizando además sus efectos regenerativos sobre el nicho ovárico. Evaluamos también los efectos de las células mononucleares normalmente presentes en sangre periférica (PBMNC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), para asegurarnos que los efectos regenerativos observados tras la infusión de BMDSC fuesen debido a las células madre presentes en este conjunto heterogéneo y no a los monocitos y linfocitos contaminantes. Debido a las diferencias funcionales entre tejido ovárico murino y humano, a continuación, decidimos analizar los efectos de dichas células madre en el desarrollo folicular humano. Para ello, empleamos un modelo de xenotrasplante de CO humana procedente de pacientes PR. En este modelo con tejido ovárico humano además de testar la población completa de BMDSC, evaluamos los efectos de su fracción CD133+, la fracción celular más indiferenciadas dentro de la médula ósea [148]. Finalmente, con el objetivo de evaluar la contribución del mecanismo paracrino en la regeneración ovárica analizamos la correlación entre el éxito del tratamiento con BMDSC en pacientes PR y la concentración de determinados factores de crecimiento secretados por estas células madre.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI INDUCIDOS POR QUIMIOTERAPIA

1. Diseño experimental

Inducimos condiciones de DOR-PR (en adelante modelo DOR) y POI en ratones inmunodeprimidos NOD/SCID mediante la administración de una dosis reducida y otra estándar de quimioterapia (Cy+Bu), respectivamente. Como control, se emplearon ratones tratados con dimetil sulfóxido (DMSO, vehículo de la quimioterapia). Tras la administración de los agentes quimioterapéuticos, se monitorizó diariamente la supervivencia, el peso corporal y el ciclo estral durante 21 días. A continuación, las ratonas se sometieron a una estimulación ovárica y se cruzaron con machos fértiles. Parte de las ratonas se sacrificaron tras el cruce, recogiendo los ovarios y los oviductos. Se analizaron las poblaciones foliculares, el porcentaje de folículos morfológicamente anormales, el estado del estroma ovárico (estructura, vascularización y apoptosis), así como el número de ovocitos metafase II (MII) y de embriones recuperados del oviducto. El resto de las ratonas se mantuvieron en cruces sucesivos durante un período de 12 semanas para analizar los efectos en el potencial reproductivo a largo plazo, registrándose en cada cruce la tasa de gestación y el tamaño de las camadas (Figura 16).

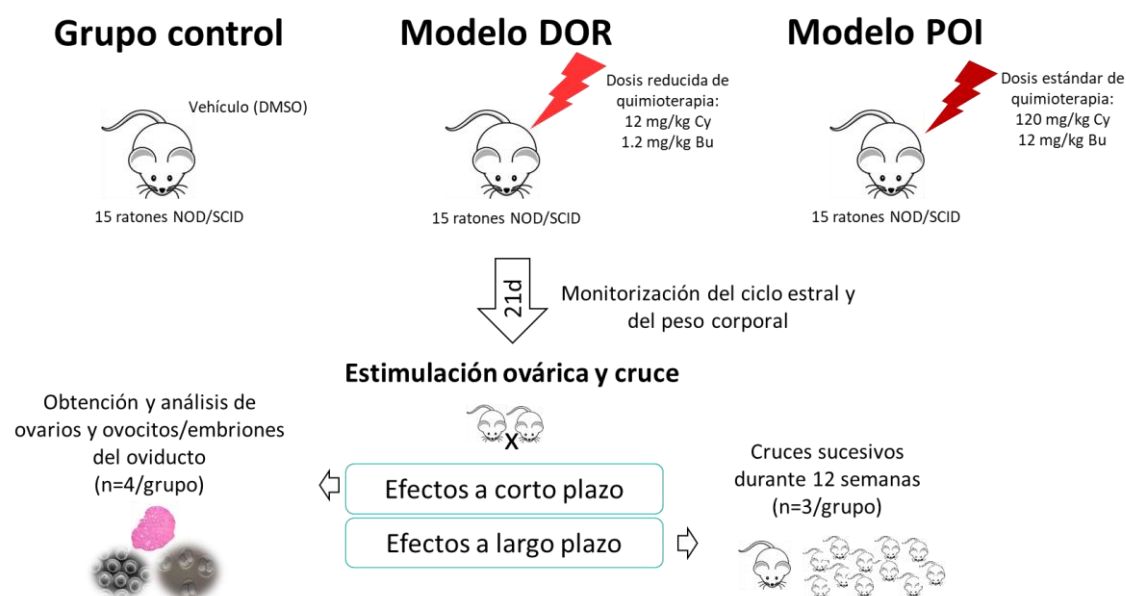


Figura 16. Diseño experimental del desarrollo y caracterización de modelos murinos de DOR y POI. Las condiciones de reserva ovárica disminuida (DOR) e insuficiencia ovárica prematura (POI) se indujeron mediante una dosis reducida y otra estándar de ciclofosfamida (Cy) y busulfan (Bu), respectivamente. Como control, se emplearon ratones tratados con el vehículo de la quimioterapia, es decir, con dimetil sulfóxido (DMSO). Tras estimulación ovárica y cruce con machos fértiles analizamos los efectos a corto (sacrificio tras la estimulación) y a largo plazo (cruces sucesivos durante 12 semanas) sobre la fertilidad.

2. Preparación del tratamiento quimioterapéutico

Se prepararon dos dosis distintas de quimioterapia, una reducida y otra estándar, para inducir condiciones de DOR y POI, respectivamente. Como quimioterapéuticos se usaron los agentes alquilantes Cy y Bu por su alto riesgo de inducción de POI [180]. Para preparar la dosis estándar, se disolvieron 48 mg de Cy (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) y 4,8 mg de Bu (Sigma, St. Louis MI) en 2 mL de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). A continuación, se realizó una dilución 1:10 de la anterior en DMSO, obteniéndose así la dosis reducida de quimioterapia. Ambas soluciones se filtraron empleando un filtro de 0,45 μ m de tamaño de poro (VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) y se utilizaron inmediatamente después de su preparación. Todos los pasos se realizaron en condiciones de esterilidad trabajando en cabina de flujo laminar.

3. Estabulación y manejo de los animales

La experimentación animal se realizó en el estabulario autorizado de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de octubre de 2005 y el Convenio Europeo 1-2-3, 18 de marzo de 1986). Los procedimientos de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (A1484581669445) y por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca, Generalidad Valenciana. Además, cumplieron los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio (*Nacional Institutes of Health*, NIH; publicación nº 85-23, revisado en 1985).

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 10\%$), con acceso libre a comida (en formato pellet) y bebida.

4. Daño ovárico inducido por quimioterapia: establecimiento de condiciones de DOR y POI

Se utilizaron 45 ratones hembra de 8 semanas de edad de la cepa NOD-SCID (Charles River Laboratories, Écully, France). Los ratones de esta cepa poseen una mutación que afecta al desarrollo de linfocitos T y B y a la funcionalidad de las células Natural Killer. Por tanto, poseen un sistema inmune deficiente (inmunodeprimidos), siendo por ello de

especial interés y utilidad en experimentos de xenotrasplante e infusión de células de origen humano.

Los 45 ratones se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos experimentales (n=15/grupo): Control (vehículo), DOR y POI. La aleatorización se realizó empleando la herramienta virtual random.org. Los ratones del grupo DOR se trataron con la dosis reducida de quimioterapia: una única inyección intraperitoneal de 12 mg/kg de Cy + 1,2 mg/kg de Bu. Por su parte, los ratones del grupo POI recibieron una dosis estándar de quimioterapia equivalente a la utilizada en pacientes con cáncer [197, 198]: única inyección intraperitoneal de 120 mg/kg de Cy + 12 mg/kg de Bu. Finalmente, los ratones del grupo control recibieron una inyección intraperitoneal de 100 µL de DMSO (vehículo). Todas las inyecciones intraperitoneales se realizaron en la zona abdominal empleando jeringuillas de 1 mL (VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) y agujas hipodérmicas Sterican® de calibre 27G (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España).

5. Estimulación ovárica controlada y cruce con machos fértiles

Veintiún días después de la administración de quimioterapia, los ratones de los distintos grupos experimentales se sometieron a una hiperestimulación ovárica.

Se prepararon en cabina de flujo laminar soluciones de 10IU/100µL de Gonadotropina Coriónica Equina (PMSG, del inglés *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) (G4877-1000IU, Sigma-Aldrich, St. Louis MI) y de 10 IU/100µL de Gonadotropina Coriónica humana (hCG, del inglés *human Chorionic Gonadotropin*) (C1063-1VL, Sigma-Aldrich, St. Louis MI) empleando suero fisiológico (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España). Ambas soluciones se filtraron empleando un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) y se congelaron en alícuotas a -20°C hasta su uso.

El protocolo de estimulación consistió en la inyección intraperitoneal de 10 IU de PMSG, (para inducir el crecimiento y la maduración de los folículos) y 48 horas después de 10 IU de hCG (para inducir la ovulación de los ovocitos contenidos en esos folículos). Ambas administraciones se realizaron en la zona abdominal empleando jeringuillas de 1 mL (VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) y agujas hipodérmicas Sterican® de calibre 27G (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España).

Tras la inyección de hCG, cada una de las ratonas de los distintos grupos experimentales se cruzó con un macho fértil de la cepa C57BL/6 (cruces individualizados 1 macho:1 hembra).

6. Monitorización del estado de salud, el peso corporal y el ciclo estral tras inducción DOR-POI

Desde el día de la administración de la quimioterapia (día 0, D0) hasta el día de inicio de la estimulación ovárica (D21), se monitorizó diariamente el peso corporal y el ciclo estral de los animales. Además, se observó minuciosamente a los animales, registrando cualquier indicio de dolor o alteración en su comportamiento, así como su intensidad y duración.

La monitorización del peso corporal se realizó pesando a los animales cada día entre las 10:00 y las 11:00 AM utilizando una báscula de 0,1g de precisión.

Por otro lado, realizamos frotis vaginales diarios a todos los animales entre las 10:00 y las 11:00 AM con el fin de monitorizar el ciclo estral. A diferencia de las mujeres, los roedores presentan un ciclo estral y no un ciclo menstrual. El ciclo estral se divide en cuatro fases que están determinadas por cambios en los niveles circulantes de estradiol (Figura 17) y es considerado en ratones uno de los marcadores más fácilmente medible del declive reproductivo [199]. Para realizar el frotis vaginal se empleó una jeringuilla de 1 ml (VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) con 100 µl de suero fisiológico (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España). Apoyando la jeringuilla en el inicio del orificio vaginal (sin penetrar en el mismo), se depositó y se recogió la mitad del volumen (aproximadamente 50 µl) un mínimo de 20 veces. Finalmente, los 100 µl se extendieron en un portaobjetos que se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente (TA). Una vez secos, los frotis se tiñeron con violeta cristal al 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) durante 1 minuto (min), realizando posteriormente dos lavados sucesivos de 1 min con agua miliQ. Tras su tinción, los frotis vaginales se evaluaron bajo microscopio óptico con el fin de determinar la fase del ciclo estral en el momento de la obtención de la muestra. Para ello se tuvo en cuenta tanto el tipo celular mayoritario en la muestra (célula epitelial, célula cornificada o leucocito), como la densidad celular de la misma. Así, consideramos: Proestro (P), cuando el tipo celular principal eran células epiteliales con núcleo; Estro (E): células cornificadas en gran densidad; Metaestro (M): alta densidad celular, siendo los tipos celulares más abundantes los leucocitos y las células cornificadas, o únicamente los leucocitos; Diestro (D): baja densidad celular,

siendo el tipo celular principal los leucocitos, aunque con posible presencia de células epiteliales pequeñas. A la hora de representar el ciclo estral agrupamos las fases de M y D en una única, que nombramos D o fase leucocitaria.

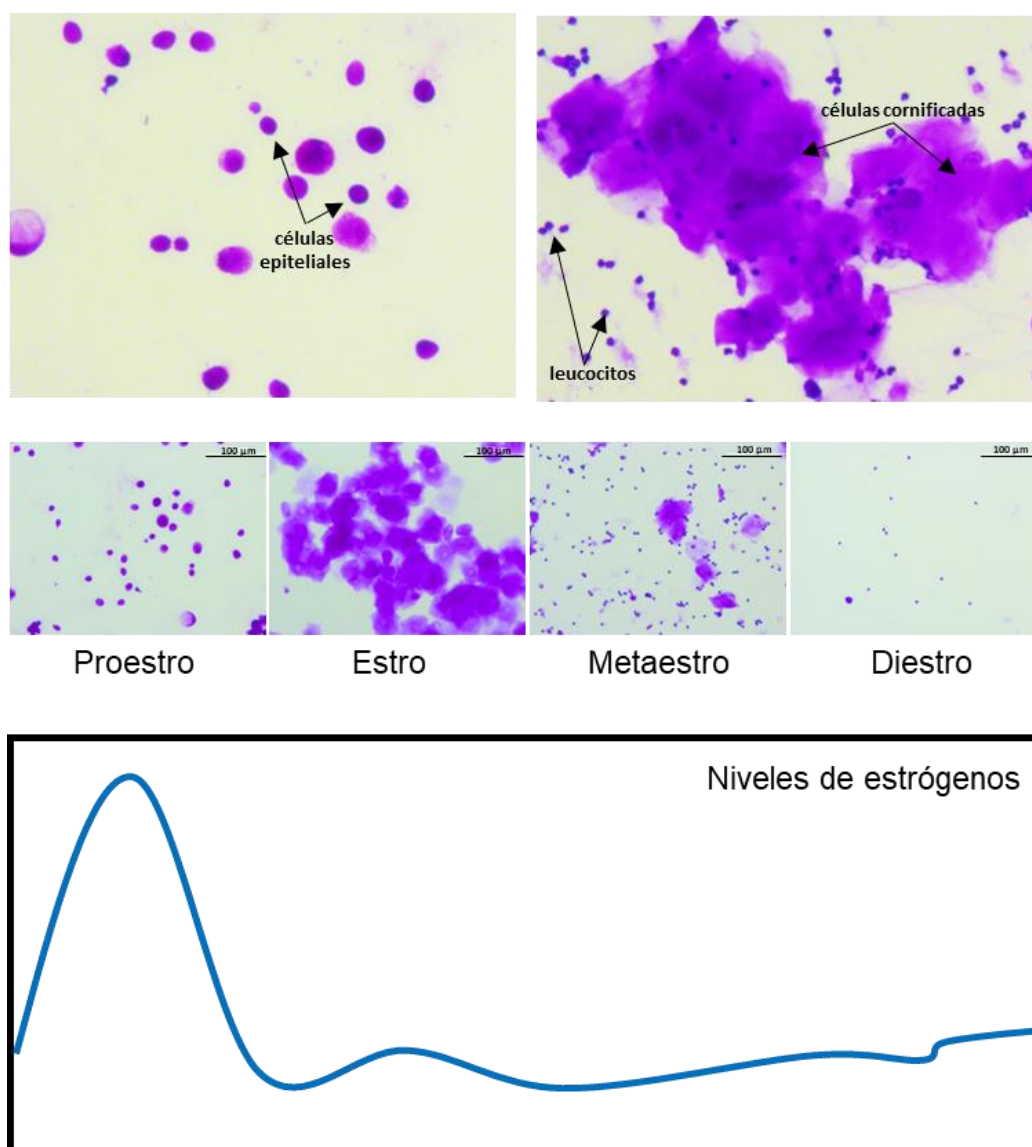


Figura 17. Tipos de células presentes en los frotis vaginales en las distintas fases del ciclo estral. Se muestran e indican los tres tipos de células que se pueden encontrar en un frotis vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos. Se muestra también un frotis vaginal representativo de cada una de las fases del ciclo, así como la variación en los niveles de estradiol a lo largo del ciclo estral de un ratón.

La longitud del ciclo estral se estableció teniendo en cuenta la definición establecida por Felicio *et al.* [200]:

- D1, presencia de células epiteliales pequeñas

- Antes del D1, presencia de leucocitos en abundancia
- Después del D1, al menos 1 día con presencia de células cornificadas en abundancia
- Después de la fase de células cornificadas, aparición de leucocitos en alta densidad.

Teniendo en cuenta estos criterios, la longitud del ciclo estral se calculó como el período entre el D1 de un ciclo y el D1 del siguiente ciclo.

7. Sacrificio y obtención de muestras

Cuatro ratonas de cada grupo se sacrificaron 36 horas después del cruce, registrando su peso corporal antes del sacrificio. El sacrificio se realizó por dislocación cervical, y tras el mismo se extrajo el sistema reproductor femenino (ovarios, oviductos y útero), manteniéndolo en una placa Petri con tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS; Biowest, Nuaille, Francia) sobre una placa calefactora a 37°C. Además, se realizó una necropsia de los animales con el fin de detectar cualquier alteración macroscópica en el resto de los órganos. Bajo lupa binocular, se eliminó del conjunto ovarios-oviductos-útero la mayor cantidad de grasa posible para evitar una posterior confusión de los ovocitos/embriones con micelas de grasa. Se separaron los oviductos de ovario y útero cortando con un bisturí y asegurándose de no perder parte del oviducto. Los oviductos se pasaron a una placa Petri con medio FMH (Vitrolife, Gotemburgo, Suecia).

8. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo

8.1. Análisis de la reserva folicular

Tras separarse de los oviductos, los ovarios se pesaron con una balanza de precisión. A continuación, se sumergieron en paraformaldehído (PFA) al 4% (Panreac Química S.A.U, Barcelona España) para su posterior análisis histológico.

8.1.1. Inclusión en parafina y cortes histológicos

Los ovarios sumergidos en PFA 4% se incluyeron en parafina (Panreac Química S.A.U, Barcelona España), previa deshidratación mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol y xilol (Merck, Darmstadt, Alemania), tal y como se muestra en la tabla 2. Posteriormente, empleando un microtomo de rotación HM-340E (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), se realizaron cortes seriados de 4 µm que se adhirieron a portaobjetos *SUPERFROST® PLUS* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Tabla 2. Protocolo de inclusión en parafina.

Reactivo	Tiempo (min)
Etanol 70%	60
Etanol 96%	60
Etanol 96% II	60
Etanol 100% I	60
Etanol 100% II	60
Etanol 100 % III	60
Xilol I	20
Xilol II	20
Xilol III	20
Parafina I	60
Parafina II	60

8.1.2. Recuentos foliculares

Con el objetivo de realizar un recuento correcto del número de folículos presentes en cada ovario, el primero de cada 5 cortes seriados de 4 μm se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E). Este criterio se estableció teniendo en cuenta que el tamaño de los folículos primordiales en ratón es de aproximadamente 20 μm .

En primer lugar, las secciones ováricas se desparafinaron incubando las muestras 1 hora a 60°C y realizando tres pases sucesivos por xilol. A continuación, los cortes se hidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones decrecientes de etanol (etanol 100% I, etanol 100% II, etanol 96%, etanol 70%, H₂O destilada). Posteriormente, los cortes se tiñeron con hematoxilina (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) durante 5 min y con eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) durante otros 5 min, lavando bien con agua corriente tras cada una de las tinciones. Por último, los cortes se deshidratan mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol y xilol y se montaron con medio de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich St. Louis MI) para su posterior observación bajo microscopio óptico. Los folículos se clasificaron de la siguiente forma (Figura 18): folículo primordial: ovocito rodeado por una capa de CG aplanadas; folículo primario: ovocito rodeado por una capa completa de CG cuboidales; folículo secundario: ovocito rodeado por dos-tres capas de CG cuboidales; folículos preantrales terciarios: más de tres capas de CG; folículos antrales: con cavidad antral; y folículos preovulatorios: de mayor tamaño, con un gran antro y con el ovocito en una esquina rodeado por las

células del cúmulo. Para evitar el doble conteo de folículos primarios, secundarios, terciarios, antrales y preovulatorios sólo se consideraron los folículos morfológicamente normales con el núcleo del ovocito presente en la sección.

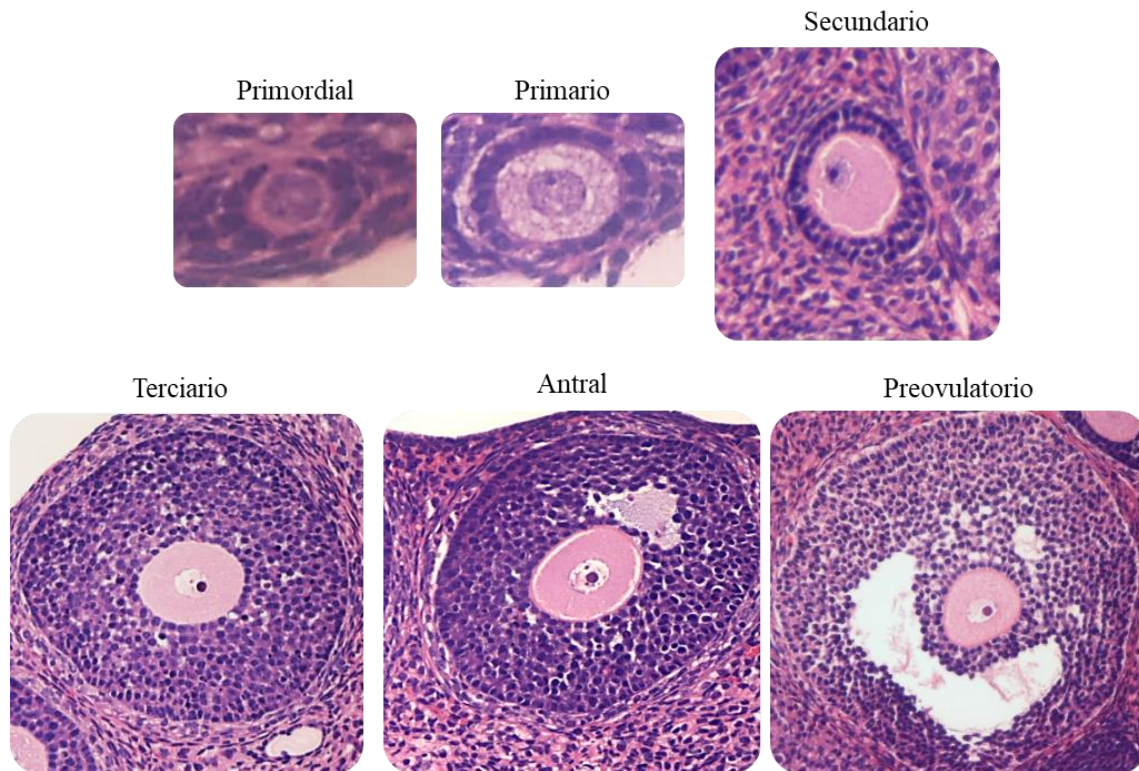


Figura 18. Clasificación folículos. Secciones histológicas con folículos de ratón en las diferentes fases del desarrollo folicular. De izquierda a derecha: folículo primordial, secundario, terciario, antral y preovulatorio.

Por otro lado, se contaron los folículos morfológicamente anormales y se calculó su porcentaje respecto al total de folículos del ovario. Consideramos folículo morfológicamente anormal todo aquel que presentaba al menos una de las siguientes alteraciones (Figura 19):

- Doble ovocito (folículos multiovocito).
- Citoplasma del ovocito (ooplasma) muy vacuolado.
- Alteraciones a nivel de la granulosa: pérdida de la unión entre las capas de la granulosa, desestructuración o pérdida parcial o total de la capa de células que rodea al ovocito.
- Degeneración estructural.

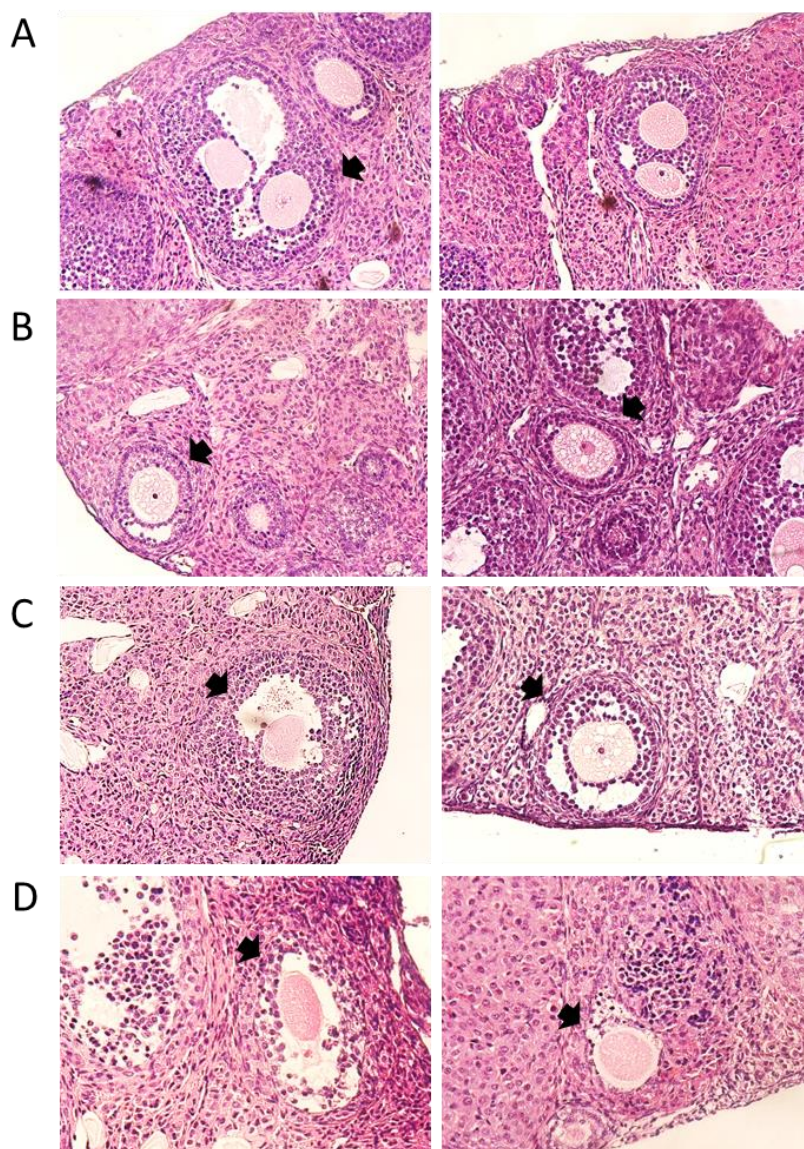


Figura 19. Tipos de folículos morfológicamente anormales. Se representan secciones ováricas de ratón con folículos morfológicamente anormales: A) Folículos con doble ovocito; B) Folículos con ooplasma vacuolado; C) Folículos con alteraciones en la granulosa; D) Folículos degenerados.

8.2. Recuperación y análisis del número de ovocitos MII y embriones de 2 células

Bajo lupa binocular se pasó medio FMH a través del oviducto. Con tal fin, se introdujo una aguja de calibre 30G (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España) en el infundíbulo y se hizo pasar el medio a través del oviducto en dirección al extremo en contacto con el útero. El paso de medio se realizó en este sentido para evitar el daño de los ovocitos/embriones que podría causar la válvula unidireccional situada en la interfaz útero-oviducto. Seguidamente, con la ayuda de la lupa binocular y de una pipeta de decumulación con capilar de 170 μm (*Flexipet Adjustable Handle Set*, Cook Medical,

Indiana, USA), se aislaron los ovocitos y embriones obtenidos y se clasificaron atendiendo a sus parámetros morfométricos. Concretamente, en el caso de los ovocitos consideramos como ovocito MII morfológicamente normal o viable aquel con un ooplasma homogéneo, una zona pelúcida proporcionada, bien definida y regular y un espacio perivitelino no ensanchado con un único corpúsculo polar. Por su parte, consideramos un embrión morfológicamente normal aquel con dos blastómeras simétricas, no fragmentadas y con una zona pelúcida proporcionada (Figura 20).

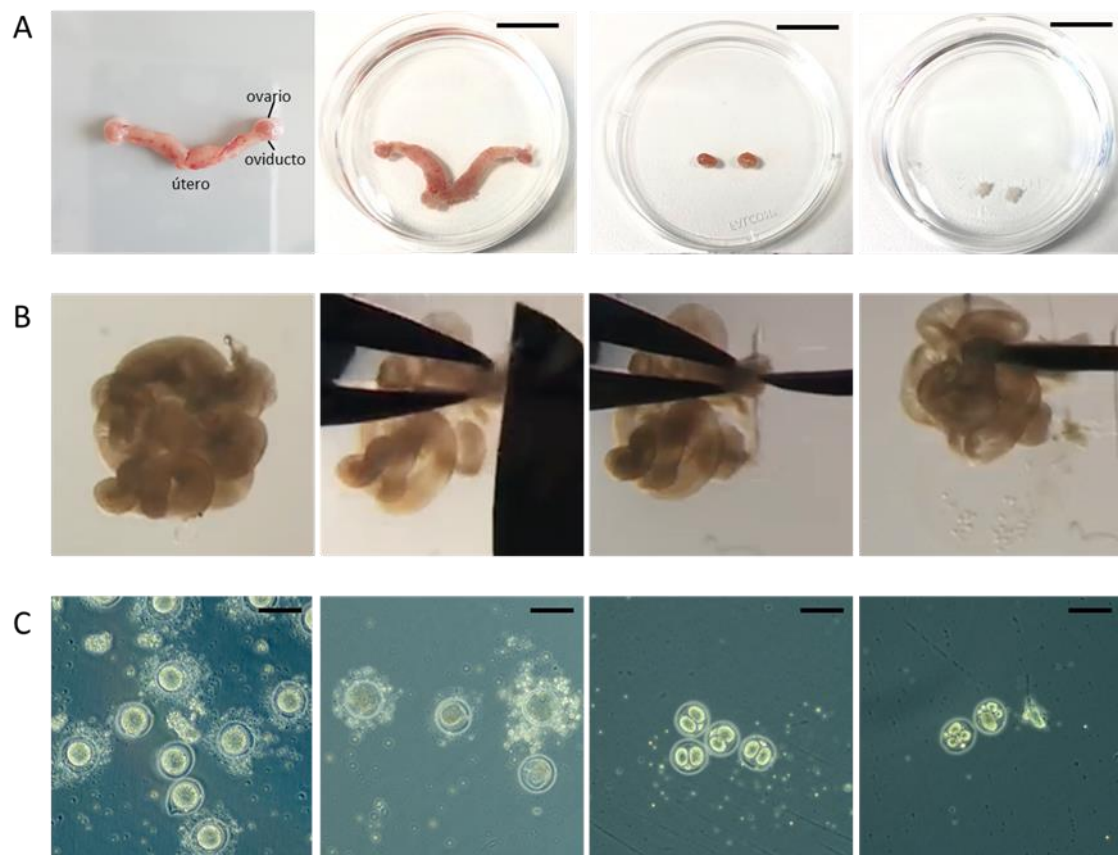


Figura 20. Proceso de obtención de ovarios, ovocitos y embriones. A) De izquierda a derecha, partes del aparato reproductor femenino, ovarios y oviductos. Barra de escala=1 cm. B) Se muestra el proceso de obtención de ovocitos y embriones del oviducto haciendo pasar medio por el interior del oviducto mediante una aguja. C) De izquierda a derecha, ovocitos MII viables o morfológicamente normales, ovocitos MII morfológicamente anormales, embriones morfológicamente normales y embriones morfológicamente anormales. Barra de escala=100µm.

9. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo

Tras la estimulación ovárica y cruce con machos fértiles, tres de las ratonas de cada grupo no se sacrificaron a las 36 h, sino que se mantuvieron en cruces sucesivos durante un período de 12 semanas. Cada cruce se mantuvo un total de 7 días, individualizando a

las hembras tras dicho período y manteniéndolas individualizadas hasta el momento del parto. A lo largo de las 12 semanas, se realizaron un total de tres intentos de cruce. En cada intento de cruce se registró la tasa de gestación (nº de hembras gestantes/nº total de hembras del grupo), el tamaño de las camadas obtenidas (nº de crías que tuvo cada una de las hembras), así como y el peso de las crías el día del nacimiento y la distribución de sexos (relación entre el número de hembras y machos en cada una de las camadas).

10. Evaluación del estroma ovárico

Teniendo en cuenta la importancia del nicho ovárico en el desarrollo folicular y su alteración en pacientes con DOR y POI, analizamos el estado del estroma ovárico en ambos modelos de daño ovárico. Concretamente, analizamos la degeneración del tejido ovárico, la densidad microvascular (MVD, del inglés *Microvessel Density*) y la apoptosis o muerte celular programada.

10.1. Degeneración del estroma ovárico

Para analizar la degeneración del estroma ovárico se emplearon cuatro secciones ováricas representativas de cada muestra teñidas con H&E. De cada una de las secciones ováricas se obtuvieron un total de cuatro imágenes al 20x empleando un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) y una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Consideramos como área degenerada todas aquellas zonas dentro del ovario en las que se observó pérdida de la estructura tisular y ausencia de núcleos. Mediante el software *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA) se cuantificó el área degenerada y el área total del tejido, calculándose la tasa de degeneración como área degenerada respecto a área total de tejido.

10.2. Vascularización

El análisis de la vascularización del estroma ovárico se realizó combinando el empleo de la isolectina B4 (IB4) con una inmunofluorescencia frente a la actina alfa de músculo liso (α -SMA, del inglés *alpha Smooth Muscle Actin*). La IB4 es una proteína aislada de *Griffonia Simplicifolia* utilizada ampliamente como marcador de células endoteliales de ratón, rata, cabra y conejo debido a su capacidad de unirse específicamente a una glicoproteína presente en la membrana de estas células. Por su parte, α -SMA es una actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros, así como en la lámina muscular y en la lámina propia de la mucosa intestinal. Debido a esta especificidad, su

combinación con un marcador de células endoteliales permite detectar vasos maduros en secciones histológicas.

Se seleccionaron un total de cuatro cortes histológicos por muestra, que se desparafinaron e hidrataron tal y como se ha explicado anteriormente (sección A, apartado 8.1.2). A continuación, con el objetivo de exponer los grupos enmascarados por el PFA, las secciones se incubaron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) en un microclave (J.P Selecta) a una presión de 1.5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante una primera incubación de 30 min a TA en una solución 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂ y 0,05% Tween a pH 7,4 seguida de otra de 10 min a TA con 1% de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) y de una final de 20 min a TA con la solución de 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂ y 0,05% Tween a pH 7,4. Finalizado el bloqueo, las secciones se incubaron con la IB4 conjugada a fluoresceína (FL-1201, Vector Laboratories, Burlingame, USA) a 20 µg/mL (dilución 1:50) durante 18 horas (O/N, del inglés *overnight*) y a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con tampón tris salino con Tween (TBST; Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania), y se incubaron 30 min a TA con un anticuerpo frente a α -SMA conjugado a Alexa 594 (6198, Sigma-Aldrich, St. Louis MI) a 1:200. Tras tres lavados con TBST, las secciones se montaron con el medio de montaje con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) *ProLong Gold antifadereagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA). De cada sección ovárica se tomaron cuatro imágenes a 20x mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000 (Leica Microsystems GmbH, Alemania) y una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Se cuantificó el área positiva para la IB4 (verde) y el área del tejido mediante el software *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA), calculándose la MVD como el área de los vasos sanguíneos (área IB4+) respecto al área del tejido. Como control negativo del marcaje se empleó una sección incubada con α -SMA pero no con IB4, mientras que como control positivo se empleó una sección de cerebro de ratón.

10.3. Apoptosis

La apoptosis en los ovarios se analizó mediante TUNEL (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*). Esta técnica permite detectar la fragmentación del DNA (del inglés, *DeoxyriboNucleic Acid*) que se produce como consecuencia de la activación de las cascadas de señalización apoptótica. Para ello, hace

uso de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal o TdT (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*), capaz de añadir dUTPs marcados a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del DNA. De todos los kits disponibles en el mercado para llevar a cabo esta técnica, en la presente tesis doctoral empleamos el kit *TMR red In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Concretamente, tras desparafinar e hidratar las secciones ováricas tal y como se ha detallado anteriormente, se llevó a cabo un desenmascaramiento antigénico empleando una solución de 10 mM de citrato de sodio a pH 6 e incubando a 850W durante 5 min en microondas. A continuación, los cortes se incubaron durante 60 min a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda con la mezcla TUNEL, formada por una solución de marcaje (dUTPs marcados con el fluoróforo TMR) y una solución enzimática (enzima TdT,). Durante esta incubación, la TdT añade en las células apoptóticas moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del DNA. Finalmente, se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS; VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España), y se montaron las muestras con el medio de montaje con DAPI *ProLong Gold antifadereagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA), dejándose O/N a TA. Se incluyeron un control positivo y un control negativo del marcaje. Concretamente, como control positivo empleamos una sección ovárica incubada tras el desenmascaramiento con 2000 U/mL de DNAsa I en 50mM Tris + 1mg/mL de BSA a pH 7,5 durante 10 min. Como control negativo se empleó una sección ovárica incubada tras el desenmascaramiento antigénico solo con la solución de marcaje (sin la solución enzimática).

Analizamos cuatro secciones representativas de cada muestra, realizando de cada una de ellas cuatro imágenes a 20x mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000 (Leica Microsystems GmbH, Alemania) acoplado a una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Una vez obtenidas las imágenes, se cuantificó la señal TUNEL positiva (rojo) y DAPI positiva (azul) mediante el programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA, USA). Finalmente, se calculó el porcentaje de células apoptóticas como el área TUNEL positiva (núcleos apoptóticos) respecto al área DAPI positiva (núcleos).

11. Análisis estadístico

Todos los resultados se representaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS 22.0 (IBM, Somers, NY, USA), aplicando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para comparar los tres grupos, y el Mann-Whitney U-test para realizar comparaciones dos a dos. Por otro lado, para comparar la supervivencia entre grupos se realizó un análisis Kaplan-Meier. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

B) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN LOS MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI

1. Diseño experimental

En primer lugar, se movilizaron a sangre periférica las células madre de la médula ósea de diez pacientes PR mediante la inyección de G-CSF y se aislaron mediante aféresis. Por otro lado, aislamos las PBMNC de pacientes PR no sometidas a protocolo de movilización de las células madre. Ambas poblaciones celulares (BMDSC y PBMNC) se marcaron con nanopartículas férricas para su posterior localización en los animales. A continuación, testamos sus efectos en los modelos murinos de DOR y POI previamente desarrollados. Concretamente, una semana después de la inducción del daño ovárico mediante la administración de quimioterapia, dividimos a los animales de ambos modelos en tres grupos experimentales: Control, PBMNC y BMDSC. A los animales del grupo control se les inyectó PBS, a los animales del grupo PBMNC les inyectamos 1 millón de PBMNC, mientras que a los animales del grupo BMDSC les inyectamos 1 millón de BMDSC. Introducimos el grupo PBMNC para asegurarnos que los efectos regenerativos de las BMDSC fuesen debidos a las células madre presentes en este conjunto heterogéneo de células mononucleares y no a las células sanguíneas circulantes (principalmente, monocitos y linfocitos). Transcurridas dos semanas desde la terapia celular, los animales se sometieron a una estimulación ovárica mediante inyección de PMSG y de hCG, cruzándose parte con machos fértiles. De las ratonas puestas en cruce, 4 de cada grupo se sacrificaron a las 36 horas de la hCG para analizar la localización de las células inyectadas, así como los efectos regenerativos a corto plazo sobre el ovario: peso ovárico, activación y desarrollo folicular, número de ovocitos MII y embriones y estado del estroma ovárico (vascularización, apoptosis y proliferación). El resto se mantuvieron durante 12 semanas en cruces sucesivos para

determinar el potencial reproductivo a largo plazo. Finalmente, las ratonas que no se pusieron en cruce se sacrificaron 72 horas después de la inyección de hCG, para analizar la formación de cuerpos lúteos. Durante todo el experimento se monitorizó el ciclo estral de los animales de los distintos grupos (Figura 21).

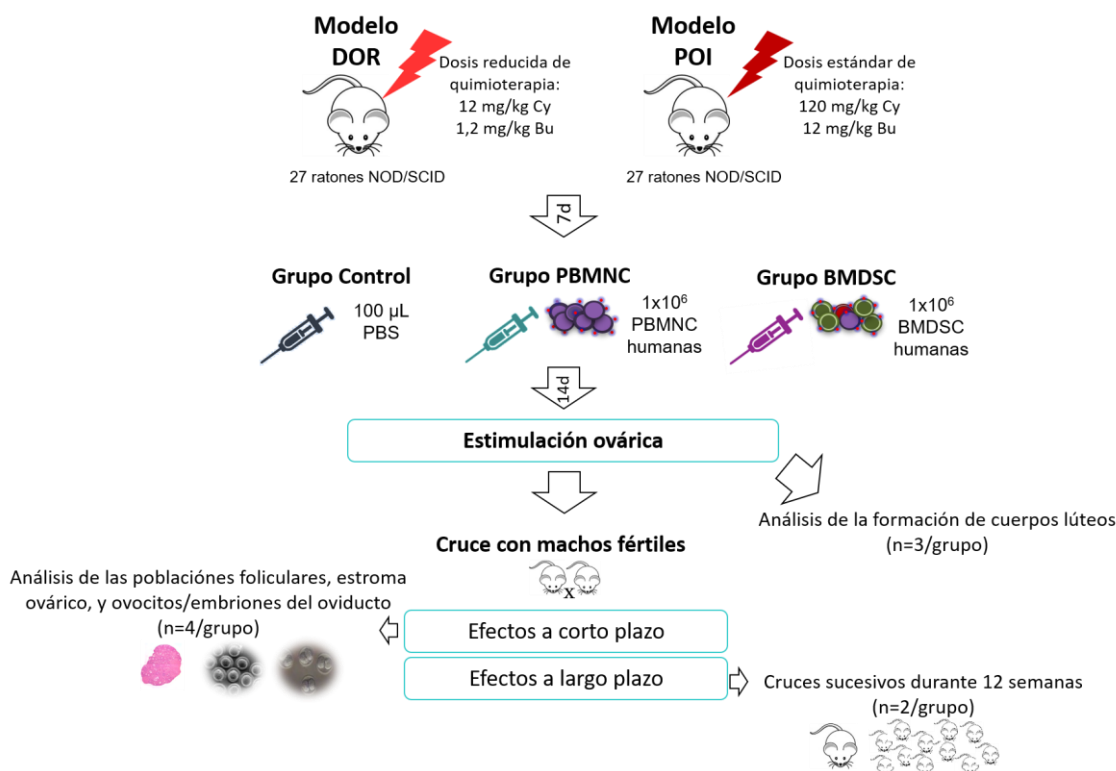


Figura 21. Diseño experimental de la evaluación de los efectos regenerativos de las BMDSC en modelos animales de daño ovárico. Una semana después de la generación del daño ovárico mediante ciclofosfamida (Cy) y busulfan (Bu), se infundió en los animales PBS (control), células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) o células madre derivadas de la médula ósea (BMDSC). Transcurridas dos semanas desde la terapia celular, se realizó una estimulación ovárica analizándose los efectos de la infusión sobre el ovario y el potencial reproductivo. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

2. Movilización de las BMDSC a sangre periférica y recuperación mediante aféresis

Las BMDSC se obtuvieron de diez mujeres PR (con una edad media de 38 ± 2 años) incluidas en el estudio piloto NTC02240342. Estas diez pacientes fueron sometidas a un tratamiento de movilización de las células madre de la médula ósea a sangre periférica. Este tratamiento consistió en la inyección subcutánea diaria de $10 \mu\text{g/kg}$ de G-CSF durante 5 días. Al quinto día, se procedió a la obtención de las BMDSC en aquellas pacientes que alcanzaron un umbral de células $\text{CD}34^+ \geq 10$ células/ μL . La recolección celular se realizó mediante procedimientos estándar de aféresis empleando un flujo

continuo en un separador celular OPTIA (Cardian, Denver, USA). Las muestras de aféresis se analizaron inmediatamente después mediante citometría de flujo.

3. Caracterización de las poblaciones celulares

Para caracterizar las poblaciones celulares dentro de la aféresis, el primer paso fue determinar el número absoluto de leucocitos en un Coulter DxH 800 (Beckman Coulter, Brea, CA). En base al resultado de este recuento se diluyó una alícuota de la aféresis con DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) de forma que no se superasen los 50×10^9 células/L. A continuación, 100 μ L de esta dilución se incubaron en un tubo TruCount™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) con los anticuerpos anti-CD133-PE (CD133/2-PE, Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania), anti-CD34-APC (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) y anti-CD45-FITC (5B1, Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania) y con 7-Amictomicina D (7-AAD) durante 15 min en oscuridad y a 4°C. Seguidamente, se destruyeron los glóbulos rojos incubando la muestra con solución hemolizante Pharm Lyse™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) durante 10 min en oscuridad a 4°C. Finalmente, la muestra se analizó empleando un citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) hasta registrar un mínimo de 200.000 eventos. Mediante el software Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España), se determinó el porcentaje de células CD34+ viables y CD133+ viables sobre la celularidad total. Además, dentro de la población de células CD133+ viables, se analizó la expresión del marcador CD34 (subpoblaciones CD133+CD34+ y CD133+CD34-) así como del marcador de leucocitos CD45. En función de la expresión de CD45, dividimos a las CD133+ viables en tres subpoblaciones: CD133+CD45++ (expresión elevada de CD45, más diferenciadas); CD133+CD45+ (baja expresión de CD45) y CD133+CD45- (ausencia de expresión de CD45). Las células no viables se excluyeron del análisis en base a su marcaje con 7-AAD. Los tubos TruCount™ se emplearon para poder determinar el número absoluto de células CD34+ viables y CD133+ viables en la aféresis:

$$N^{\circ} \text{cél}/\mu\text{L} = n^{\circ} \text{eventos de interés} \times \frac{n^{\circ} \text{perlas en el tubo TruCont}}{n^{\circ} \text{perlas leídas por el citómetro}} \times \frac{\text{factor de dilución}}{100}$$

4. Aislamiento de las BMDSC

El aislamiento de las BMDSC a partir de la aféresis se realizó mediante un protocolo estándar de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll. Concretamente, se diluyeron 4 mL de aféresis completa con DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA)

hasta un volumen final de 7 mL. Una vez diluida, la muestra de aféresis se añadió a 3 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), previamente atemperado a TA. Este paso se realizó lentamente y a velocidad constante para evitar su mezcla con el Ficoll. A continuación, se centrifugó a 400g durante 30 min para separar los distintos componentes (Figura 22). Finalizada la centrifugación, recogimos el sobrenadante (plasma) y recuperamos cuidadosamente la interfase, conteniendo las células mononucleares BMDSC.

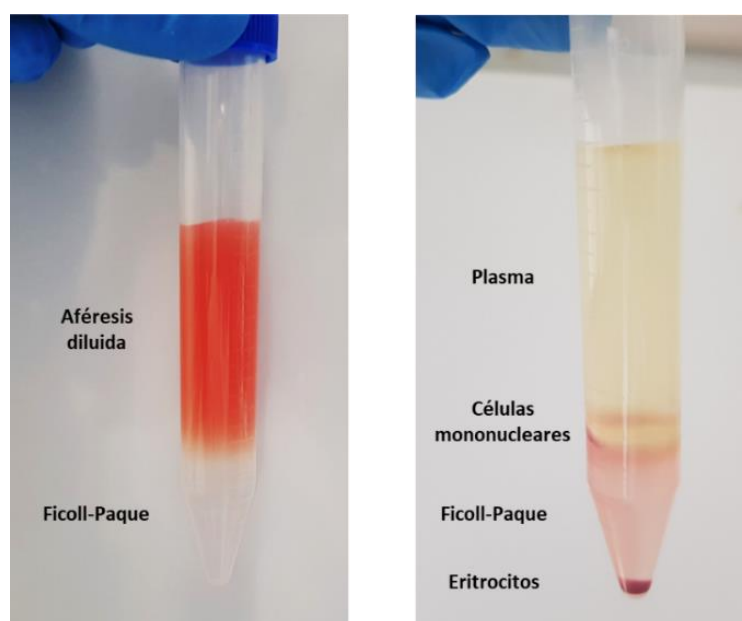


Figura 22. Aislamiento de las BMDSC mediante centrifugación en gradiente de densidad. Al centrifugar la aféresis sobre Ficoll-Paque (imagen derecha), sus distintos componentes se separan en función de su densidad (izquierda).

Finalmente, se realizaron dos lavados de las células con DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) y se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) suplementado con 10 % de albúmina sérica humana (HSA, del inglés *Human Serum Albumin*; Vitrolife, Gotemburgo, Suecia) y 1X de penicilina/estreptomicina (P/S, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). La suspensión celular se congeló con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis MI) mediante un protocolo de congelación a -1°C/min hasta -80°C empleando un Mr Frosty™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Las células se almacenaron posteriormente a -196°C en nitrógeno líquido hasta su uso.

5. Obtención de las PBMNC

Se obtuvo sangre periférica de pacientes PR no sometidas a movilización con G-CSF empleando tubos BD Vacutainer® con EDTA_{K2} (BD Diagnósticos, España). A continuación, aislamos las células mononucleares (las PBMNC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll, tal y como se ha detallado en el apartado anterior. Al igual que las BMDSC, las PBMNC se congelaron en medio RPMI+10%HSA+1XP/S+10%DMSO empleando un Mr Frosty™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), almacenándose posteriormente a -196°C en tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

6. Viabilidad y marcaje celular

Con el fin de poder localizarlas tras su inyección, las BMDSC y las PBMNC se marcaron con Ion Molday – Rodamina B (MIRB, del inglés *Molday Ion – Rhodamine B*). Este sistema de marcaje está basado en el empleo de nanopartículas paramagnéticas de hierro conjugadas al fluoróforo rodamina, y permite la visualización de las células marcadas tanto mediante tinción *Prussian Blue* (detección de depósitos de hierro) como mediante microscopia de fluorescencia (detección de la señal de emisión del fluoróforo rodamina).

Para ello, las células se descongelaron de forma rápida, sumergiendo los crioviales durante 2 min en baño de agua a 37°C en agitación. Posteriormente, se eliminó de forma gradual el crioprotector (DMSO), resuspendiendo finalmente las células en medio RPMI+10%HSA+1XP/S a 1×10^6 células/mL.

6.1. Determinación de la viabilidad celular

Tras la descongelación, se separó una alícuota de 100.000 células, que se empleó para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Para esta determinación, las células se incubaron durante 15 min con 7-AAD (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y luego se analizaron mediante un citómetro de flujo FC500 MCL (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA). La 7-AAD es un compuesto químico fluorescente con alta afinidad por el DNA. Se utiliza comúnmente como marcador de viabilidad celular al ser capaz de atravesar exclusivamente la membrana de las células muertas, intercalándose en la doble hebra de DNA. Así pues, se consideraron células vivas aquellas negativas para 7-AAD (no emisión a 650 nm). El umbral de detección de fluorescencia a 650 nm se estableció empleando como control negativo una alícuota celular no incubada con 7-

AAD. La viabilidad celular se calculó como la ratio entre el número de eventos celulares negativos para 7-AAD y el número total de células.

6.2. Marcaje con MIRB

El marcaje celular se realizó incubando 1×10^6 de células con 50 $\mu\text{g/mL}$ de MIRB durante 18 horas a 37°C y 5% CO_2 . Finalizada esta incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS con calcio y magnesio (Biowest, Nuaille, France) a una concentración de 1×10^6 células/ $100 \mu\text{L}$. Tras los lavados, separamos aproximadamente 100.000 células para evaluar la eficiencia del marcaje mediante citometría de flujo. Para ello, pasamos las células por un citómetro de flujo FC500 MCL (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA), midiendo la señal de la rodamina B a 575 nm. La eficiencia del marcaje se calculó como la ratio entre el número de eventos rodamina B positivos y el número total de células. Se empleó una suspensión celular no marcada con MIRB como control negativo para establecer el umbral de detección de fluorescencia a 575 nm.

7. Estabulación y manejo de los animales

Al igual que en la sección A de la presente tesis doctoral, la experimentación animal se realizó en el animalario autorizado de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea. Los procedimientos de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (A1484581669445) y por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca, Generalidad Valenciana. Además, cumplieron los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 10\%$), con acceso libre a comida y bebida.

8. Experimentación animal

Se utilizaron un total de 54 ratonas de la cepa NOD/SCID de 8 semanas de edad (Charles River Laboratories, France), que fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales: DOR-Control, DOR-PBMNC, DOR-BMDSC, POI-Control, POI-PBMNC y POI-BMDSC. Las condiciones de DOR y POI se indujeron mediante quimioterapia siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (sección A, apartado 4). Una semana después de la generación del daño ovárico (D0), las ratonas de los grupos control recibieron una inyección intravenosa de $100 \mu\text{L}$ de PBS, las ratonas

de los grupos PBMNC recibieron una inyección intravenosa de 1×10^6 de PBMNC marcadas con MIRB y las ratonas de los grupos BMDSC recibieron una inyección intravenosa de 1×10^6 de BMDSC marcadas con MIRB. Todas las inyecciones se realizaron a través de la vena de la cola, empleando una aguja de calibre 27G (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España). Transcurridas dos semanas desde la inyección celular (D14), los animales se sometieron a una estimulación ovárica con 10IU de PMSG y 10IU de hCG siguiendo el protocolo descrito en la sección A, apartado 5. Finalmente, seis de las ratonas de cada grupo se cruzaron con machos fértiles (cruces individualizados de 1 macho con 1 hembra).

Durante todo el experimento se monitorizó el ciclo estral siguiendo el protocolo ya descrito (sección A, apartado 6).

9. Sacrificio y obtención de muestras

De las hembras en cruce, cuatro por grupo se sacrificaron 36 horas después de la inyección de hCG, registrando su peso corporal antes del sacrificio. El sacrificio se realizó por dislocación cervical, y tras el mismo se extrajo el sistema reproductor femenino (ovarios, oviductos y útero), manteniéndolo en una placa Petri con DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) sobre una placa calefactora a 37°C hasta la obtención de los ovocitos y embriones del oviducto y aislamiento de los ovarios.

Tras separarse de los oviductos bajo lupa binocular, los ovarios se pesaron con una balanza de precisión. A continuación, uno de los ovarios de cada animal se sumergió en PFA al 4% (Panreac Química S.A.U, Barcelona España) y el otro en nitrógeno líquido. Los ovarios fijados en PFA 4% se incluyeron en parafina y se cortaron tal y como se ha detallado con anterioridad (sección A, apartado 8.1.1) para analizar histológicamente la presencia de las células inyectadas, realizar recuentos foliculares, así como para evaluar el estado del nicho ovárico (vascularización, apoptosis y proliferación). Los ovarios sumergidos en nitrógeno líquido se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Por otro lado, las ratonas que no se pusieron en cruce tras la estimulación se sacrificaron 72 horas después de la inyección de hCG para analizar la formación de cuerpos lúteos. El sacrificio se realizó también por dislocación cervical, recogiendo únicamente los ovarios. Éstos fueron fijados en PFA 4% para su posterior inclusión en parafina, corte, tinción H&E y recuento de cuerpos lúteos.

10. Localización de las células inyectadas

La presencia en los ovarios de las células inyectadas se evaluó mediante tinción *Prussian blue* (HT20; Sigma-Aldrich St. Louis MI), aprovechando su previo marcaje con las nanopartículas ferrosas MIRB. En esta tinción los depósitos de hierro quedan teñidos de azul, lo que permite detectar células marcadas con nanopartículas MIRB debido a su composición ferrosa.

Tras desparafinar e hidratar las muestras (sección A, apartado 8.1.2), las secciones histológicas se incubaron con una solución de ferrocianuro potásico y ácido clorhídrico (1:1) durante 10 min, realizándose posteriormente un lavado con agua desionizada. Seguidamente, se realizó una incubación con pararosanilina durante 3-5 min y posterior lavado con agua desionizada. Finalmente, las secciones se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol y xilol, y se montaron empleando el medio de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich St. Louis MI). Se analizaron bajo microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) un total de diez secciones no sucesivas de cada muestra, tomándose imágenes mediante una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania).

11. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo

11.1. Recuentos foliculares y de cuerpos lúteos

El recuento folicular se realizó empleando el primero de cada 5 cortes seriados siguiendo la metodología descrita y clasificándose los folículos como primordiales, primarios, secundarios, terciarios, antrales y preovulatorios en base a los criterios establecidos (sección A, apartado 8.1.2). Para evitar el doble conteo sólo se consideraron los folículos morfológicamente normales con el núcleo del ovocito presente en la sección. Por otro lado, empleamos los ovarios de las ratonas no estimuladas para realizar un recuento de cuerpos lúteos basándonos en criterios morfológicos (Figura 23).

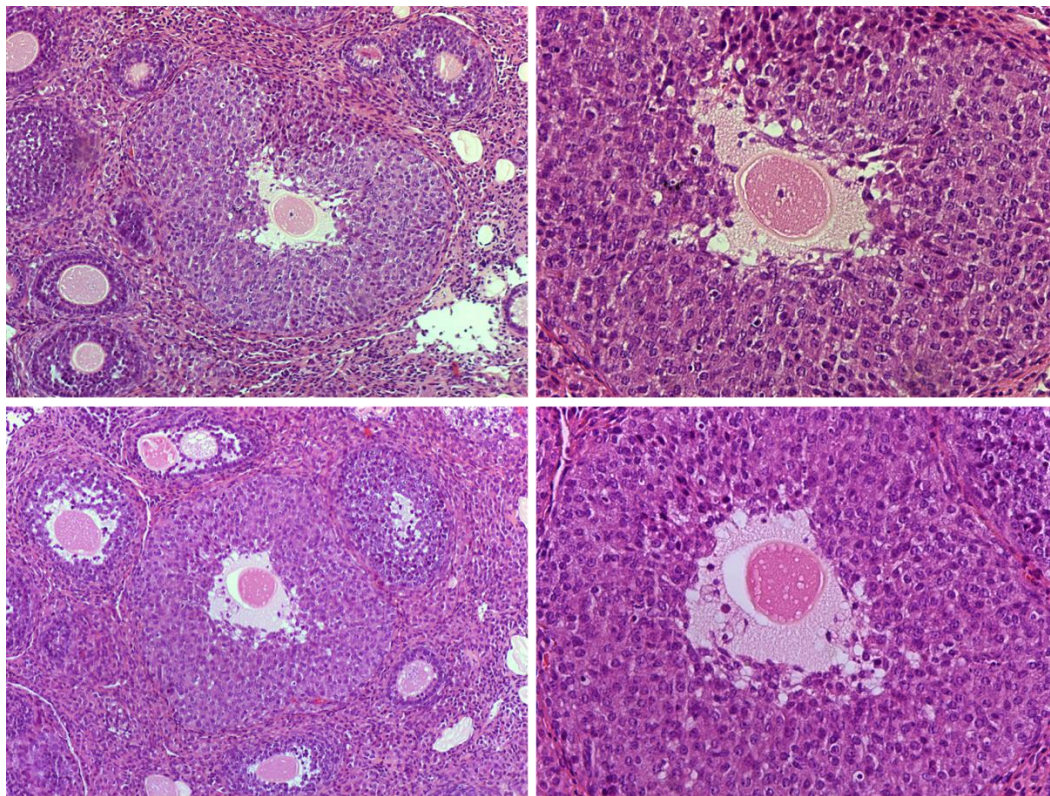


Figura 23. Cuerpos lúteos. Se muestran imágenes de cuerpos lúteos a 20x (izquierda) y a 40x (derecha). En las imágenes de la derecha se puede observar el cambio de morfología de las células de la Teca y de la granulosa al formarse el cuerpo lúteo, convirtiéndose éstas en células luteínicas.

11.2. Recuperación y análisis del número de ovocitos MII y embriones de 2 células

La obtención de los ovocitos y embriones del oviducto se realizó siguiendo el protocolo detallado en la sección A, apartado 8.2. A continuación, con la ayuda de la lupa binocular y de una pipeta de decumulación con capilar de 170 μm (*Flexipet Adjustable Handle Set*, Cook Medical, Indiana, USA), se aislaron los ovocitos y embriones obtenidos y se clasificaron atendiendo a sus parámetros morfométricos.

12. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo

Con el objetivo de evaluar el efecto de las BMDSC y de las PBMNC sobre el potencial reproductivo a largo plazo, parte de las ratonas no se sacrificaron tras el cruce, sino que se mantuvieron en cruces sucesivos durante un período de 12 semanas. Cada cruce se mantuvo un total de 7 días, individualizando a las hembras tras dicho período y manteniéndolas individualizadas hasta el momento del parto. A lo largo de las 12 semanas, se realizaron un total de tres intentos de cruce. En cada intento de cruce se registró la tasa de gestación (n° de hembras gestantes/ n° total de hembras del grupo), el

tamaño de las camadas obtenidas (nº de crías que tuvo cada una de las hembras), así como el peso de las crías el día del nacimiento y la distribución de sexos (relación entre el número de hembras y machos de cada una de las camadas). Todos los cruces se realizaron de forma individualizada y en una ratio 1:1, es decir un macho por cada hembra.

13. Evaluación del estroma ovárico

Teniendo en cuenta la importancia del nicho ovárico en el desarrollo folicular, decidimos analizar si las BMDSC eran capaces de regenerarlo, promoviendo así la activación y el crecimiento folicular. Concretamente, analizamos la vascularización, la apoptosis y la proliferación celular.

El análisis histológico de la vascularización y de la apoptosis se realizó siguiendo la metodología ya descrita (sección A, apartados 10.2 y 10.3). En consecuencia, a continuación, se detalla exclusivamente el protocolo seguido para analizar la vascularización a nivel de RNA mensajero (mRNA, del inglés *messenger ribonucleic acid*), así como el análisis de la proliferación celular en los ovarios.

13.1. Análisis de la vascularización mediante PCR cuantitativa a tiempo real

El análisis de la vascularización a nivel de mRNA, se realizó evaluando la expresión del gen *Cd31*. El gen *Cd31* codifica para una glicoproteína integral de membrana que se expresa en altos niveles en células endoteliales tempranas y maduras, motivo por el cual se utiliza frecuentemente como marcador de vasos sanguíneos.

13.1.1. Extracción del mRNA

En primer lugar, se aisló el mRNA de los ovarios almacenados a -80°C empleando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, los ovarios se lisaron y homogeneizaron con un tampón de lisis (conteniendo guanidina-tiocinato altamente desnaturizante) y con la ayuda de dos bisturís. El lisado celular obtenido, se mezcló a partes iguales (1:1) con etanol 70% (Etanol para biología molecular, Sigma, St. Louis MI) e inmediatamente después se añadió a una columna *Rneasy Mini Spin*, realizando una breve centrifugación. Estas columnas poseen una membrana a base de sílice a la que el RNA se une selectivamente, motivo por el cual en la centrifugación el RNA queda retenido, eluyéndose el resto de los componentes celulares. Una vez unido el RNA a la membrana, se realizaron varios lavados para eliminar cualquier componente no unido específicamente. Finalmente, se

eluyó el RNA en agua libre de nucleasas. Finalizada la extracción, se determinó la concentración de RNA empleando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), midiendo la absorbancia a 260 (A260). La calidad del RNA extraído se determinó en base a la relación A260/A280, considerándose valores comprendidos entre 1,7 y 2,2 como indicativos de una pureza apropiada.

13.1.2. Síntesis del cDNA

Una vez cuantificado el RNA extraído, se sintetizó el DNA complementario (cDNA, del inglés *complementary DesoxyriboNucleic Acid*) mediante el *Advantage® RT-for-PCR Kit* (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 500 ng de RNA de cada muestra (en un volumen de 12,5 µL) con 1µL oligonucleótidos dT. La mezcla se calentó en un termociclador (T3000 Thermocycler biometra) a 70°C durante 2 min para desnaturalizar las cadenas de RNA y evitar la formación de estructuras secundarias. A continuación, se añadieron 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, a 10 mM cada uno), 1 µL de enzima transcriptasa reversa obtenida del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) y 0,5 µL de inhibidor recombinante de ribonucleasa. Las muestras se incubaron 1 hora a 42°C (para permitir la síntesis del cDNA por parte de la transcriptasa reversa) y, posteriormente, 5 min a 94°C (para inactivar la transcriptasa reversa y detener la reacción de síntesis). El producto final se cuantificó mediante el NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), diluyéndose hasta una concentración de 100ng de cDNA/µL con agua libre de ribonucleasas (Qiagen, Hilden, Alemania).

13.1.3. PCR cuantitativa a tiempo real

Para el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*) se emplearon sondas Taqman®: una específica para el gen *Cd31* de ratón (Mm01242576_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y otra específica para el gen reportero 18S de ratón (Mm03928990_g1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las mezclas de reacción de PCR se prepararon con 100 ng de cDNA y la sonda Taqman® correspondiente al 1X utilizando el *Taqman Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finalmente, las muestras se amplificaron empleando el *7900HT Fast PCR system* (Applied Biosystems, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Las

condiciones de PCR consistieron en una activación inicial de la uracil-N-glicosilasa a 50°C durante 2 min, seguida de una activación de la AmpliTaq Gold a 95°C durante 10 min. A continuación, se realizaron 40 ciclos consistentes en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 min a 60°C. La expresión relativa se calculó mediante el método comparativo Ct (DDCt, del inglés *Delta Delta Cycle threshold*) empleando el software *RQ Manager 1.2.1* (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

13.2. Proliferación celular

La evaluación de la proliferación celular en los ovarios se realizó mediante inmunohistoquímica frente a Ki67. Ki67 es una proteína nuclear necesaria para la proliferación que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero no en las células en reposo (G0).

Se analizaron un total de cuatro secciones representativas de cada ovario, que tras desparafinarse e hidratarse, se incubaron con una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) durante 3 min y a una presión de 1.5 Bar empleando un microclave (J.P Selecta) con el objetivo de desenmascarar los antígenos. Una vez atemperadas, las secciones se sumergieron durante 15 min en una solución de Metanol: H₂O₂ (29:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las secciones durante 1 hora en suero de caballo al 10%. Finalizado este bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki67 (ab15580, Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:500 durante 18 horas a 4°C. Seguidamente, se realizaron tres lavados con TBST (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron a TA durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Ambos anticuerpos (primario y secundario) se diluyeron en una solución de PBS con 1% de suero de caballo. Finalmente, las secciones se lavaron tres veces con TBST (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron durante 30 min a TA con un complejo avidina-biotina peroxidasa con el fin de amplificar la señal (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories). El revelado de la reacción se realizó empleando diaminobencimida (DAB) como sustrato cromogénico para la peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, USA), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción química se paró con agua, visualizando las preparaciones en un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado. La señal del DAB (marrón), se contrastó mediante una tinción suave con hematoxilina y las muestras se montaron con

medio Eukitt (Sigma-Aldrich St. Louis MI), previa deshidratación mediante pases sucesivos por etanol y xilol. Finalmente, empleando un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) acoplado a la cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania) se obtuvieron un total de cuatro imágenes por sección, que se cuantificaron mediante el programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA). El porcentaje de proliferación se calculó como:

$$\frac{\text{área Ki67} + (\text{marrón})}{\text{área total del tejido}} \times 100$$

Como control negativo del marcaje se empleó una sección ovárica incubada con el anticuerpo secundario, pero sin el anticuerpo primario.

14. Análisis estadístico

Los resultados se representaron como media \pm desviación estándar. Dentro de cada modelo (DOR o POI) las comparaciones entre los tres grupos experimentales (Control, PBMNC y BMDSC) se realizaron aplicando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis mediante el software SPSS 22.0 (IBM, Somers, NY, USA). A continuación, se realizaron comparaciones dos a dos aplicando el Mann-Whitney U-test. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

C) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN TEJIDO OVÁRICO HUMANO DE PACIENTES PR

1. Diseño experimental

Se aislaron mediante aféresis y posterior centrifugación en gradiente de densidad las BMDSC de pacientes PR sometidas a un protocolo de movilización mediante tratamiento farmacológico con G-CSF. Una vez obtenidas, se obtuvo su fracción CD133+ recurriendo a un sistema de separación magnética en columnas. Ambas poblaciones se marcaron con MIRB para su posterior localización. Por otro lado, se obtuvieron fragmentos de CO de pacientes PR. Estos fragmentos se xenotrasplantaron intraperitonealmente en 27 ratonas inmunodeprimidas NOD/SCID ovariectomizadas. Una semana después de este xenotrasplante, cuando los implantes estaban ya vascularizados, los animales se dividieron en tres grupos experimentales ($n=9/\text{grupo}$):

- Control: inyección intravenosa de 100 μL de PBS.
- BMDSC: inyección intravenosa de 1×10^6 de BMDSC.

- CD133: inyección intravenosa de 3×10^5 células CD133+.

Los implantes de CO humana se recogieron en D1, D7 y D14 tras la infusión celular. El D1 se empleó para monitorizar la migración celular o *homing* en el tejido ovárico [98], mientras que el D7 y el D14 se emplearon para analizar los efectos regenerativos de ambas poblaciones de células madre en el crecimiento folicular, evitando la fibrosis asociada a los procesos de xenotrasplante [202, 203]. Con el objetivo de investigar los mecanismos y factores implicados en los efectos regenerativos de las BMDSC sobre el tejido ovárico, decidimos analizar la expresión génica en los implantes de CO de D7 y D14 mediante matrices de expresión basados en RT-qPCR. En el sacrificio, se recogieron además otros órganos, para analizar la presencia en los mismos de las células inyectadas, así como muestras de sangre, para analizar la secreción de estradiol (Figura 24).

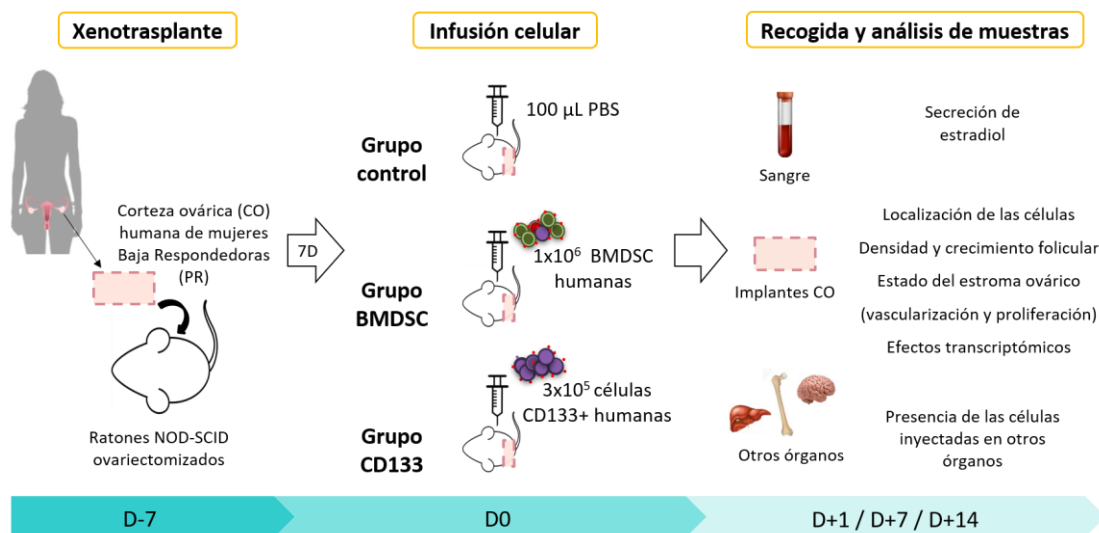


Figura 24. Diseño experimental de la evaluación de los efectos regenerativos de las BMDSC en tejido ovárico humano. Se evaluó el efecto de las células madre derivadas de la médula ósea (BMDSC) y de su fracción CD133+, en fragmentos de corteza ovárica (CO) procedentes de pacientes Baja Respondedoras (PR) xenotrasplantados en ratones inmunodeprimidos (NOD/SCID). Los implantes de CO (así como sangre y otros órganos) se recogieron en día 1 (D1), D7 y D14 tras la infusión celular, evaluándose la migración de las células inyectadas y los efectos regenerativos de las mismas, así como sus efectos transcriptómicos. Adaptada de Herraiz et al., 2018 [201].

2. Obtención de las BMDSC y de su fracción CD133+

Las BMDSC se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (sección B, apartados 2 y 4). Una vez obtenidas, se aisló su fracción CD133+ mediante separación inmunomagnética empleando el equipo *autoMACS Pro Separator* (Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania). Este equipo utiliza un sistema de columnas situadas dentro de un campo magnético, basándose la separación en el empleo de anticuerpos conjugados a partículas magnéticas. Las partículas magnéticas (y, por consiguiente, las células a las que se unen) son retenidas en las columnas mientras el campo magnético está activo, siendo eluidas cuando éste deja de actuar.

En nuestro caso, el marcaje inmunomagnético de las células CD133+ se realizó empleando el *CD133 MicroBead Kit for Hematopoietic Tissue* (Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Concretamente, tras centrifugar las BMDSC a 200g durante 5 min y eliminar el medio, se resuspendieron en DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) con 0,5% de Suero Fetal Bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) y 2mM EDTA a pH 7,2 (33×10^7 células/100 μ L). Esta suspensión celular se pasó por un filtro de 30 μ m (Sysmex, Barcelona, España) para eliminar agregados. A continuación, se incubó durante 30 min a 4°C con un reactivo de bloqueo (*FcR Blocking Reagent*) y con un anticuerpo frente al antígeno CD133 conjugado a partículas magnéticas (*CD133 Microbeads*). Finalizada la incubación, las células se lavaron dos veces con DPBS (Gibco BRL, Waltham, MA, USA) y se resuspendieron en DPBS + 0,5% FBS + 2mM EDTA a pH 7,2. Finalmente, se pasaron por el *autoMACS Pro Separator*, realizándose una separación inmunomagnética de la fracción CD133+ mediante la función del equipo *Posselds*. En este modo de separación, la suspensión celular se hace pasar por dos columnas sucesivas situadas dentro de un campo magnético, ganándose así eficacia y especificidad en la separación. La fracción celular no marcada (fracción negativa) se desechó, mientras que la fracción marcada o fracción positiva (células CD133+) se recogió en medio RPMI 1640 con 10% de HSA y 1X P/S. En todos los casos, las células CD133+ se congelaron con un 10% DMSO a -1°C/min en Mr Frosty™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), almacenándolas posteriormente a -196°C en nitrógeno líquido hasta su uso.

3. Marcaje celular y determinación de la viabilidad

Tanto las BMDSC como las células CD133+ se marcaron antes de su inyección en los animales con el fin de poderlas localizar. Para ello, tras su descongelación se incubaron

con MIRB siguiendo el protocolo previamente descrito (sección B, apartado 6). Se separó una alícuota de 100.000 células, que se empleó para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo ya descrito. Por otro lado, se separó otra alícuota de cada muestra (100.000 células) para evaluar la eficiencia del marcaje mediante citometría de flujo, siguiéndose la metodología previamente detallada.

4. Obtención y procesado de las muestras de CO humana

Tras obtener el consentimiento informado, se recogieron mediante cesárea un total de 7 biopsias de CO humana de mujeres PR sometidas a una donación de ovocitos debido a su condición de baja respuesta y a varios intentos fallidos con sus propios ovocitos. La media de edad de estas pacientes fue de 43 ± 4 años. Las biopsias ováricas (CEIM 2014/0147), de aproximadamente 1 x 1 cm, se recogieron en medio M199 libre de suero (Sigma, St. Louis MI) a 4°C y, tras eliminar la médula mediante raspado con bisturís [204], la CO se criopreservó mediante un protocolo de congelación lenta [205]. Concretamente, las piezas de CO se incubaron durante 15 min a 4°C con medio M199 (Sigma, St. Louis MI) + 5% HSA (Vitrolife, Suecia) + 5% DMSO (Sigma, St. Louis MI) en agitación. A continuación, las muestras de CO se incubaron durante otros 15 min a 4°C y en agitación con medio M199 (Sigma, St. Louis MI) + 5% HSA (Vitrolife, Suecia) + 10% DMSO (Sigma, St. Louis MI). Finalizada esta segunda incubación, los fragmentos de CO se sumergieron en medio M199 (Sigma, St. Louis MI) + 5% HSA (Vitrolife, Suecia) + 10% DMSO (Sigma, St. Louis MI) fresco y se sometieron a una congelación lenta a -1°C/min hasta -80°C empleando un Mr Frosty™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Finalmente, se almacenaron a -196°C en tanque de nitrógeno hasta su uso.

Justo antes del xenotrasplante, las muestras de CO se descongelaron de forma rápida, sumergiendo los crioviales durante 2 min en baño de agua a 37°C y en agitación. Posteriormente, se eliminó de forma gradual el crioprotector (DMSO), resuspendiendo el tejido en medio M199 fresco (Sigma, St. Louis MI). Una pequeña muestra de cada biopsia ovárica se fijó en PFA 4% para posteriormente utilizarla como control pre-xenotrasplante.

5. Estabulación y manejo de los animales

Como en las secciones A y B de la presente tesis doctoral, la experimentación animal se realizó en el animalario autorizado de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea. Los procedimientos de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (A1429108087406) y por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca, Generalidad Valenciana. Además, cumplieron los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 10\%$), con acceso libre a comida y bebida.

6. Experimentación animal: xenotrasplante de la CO e inyección celular

Se emplearon 27 ratonas adultas NOD/SCID (Charles River Laboratories, Écully, France) de 8 semanas de edad. Bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, USA; 5% para inducción y 1-2% para mantenimiento) se les realizó una ooforectomía bilateral mediante incisión dorsal. A continuación, se les xenotrasplantó un fragmento de CO humana (de aproximadamente 5 x 5 mm y 1 mm de grosor). El xenotrasplante se realizó mediante laparotomía media, fijándose el fragmento de CO sobre el lado interno del peritoneo mediante 2 puntos de sutura con Prolene 7-0 (Ethicon, New Brunswick, NJ, EE.UU.). Tanto las incisiones dorsales como la laparotomía se cerraron en dos capas utilizando sutura Vicryl5-0 (Ethicon, New Brunswick, NJ, EE.UU.). Tras la cirugía se administró subcutáneamente como analgésico buprenorfina (0,1 mg/kg; Temgesic, Schering Plough).

Una semana después del xenotrasplante los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales: Control (n=9), BMDSC (n=9) y CD133 (n=9). Los animales del grupo control recibieron una inyección intravenosa de 100 μL de PBS, los del grupo BMDSC recibieron una inyección intravenosa de 1×10^6 de BMDSC marcadas con MIRB y, finalmente, las ratonas del grupo CD133 recibieron una inyección intravenosa de 3×10^5 células CD133+ marcadas con MIRB. Todas las inyecciones se realizaron a través de la vena de la cola, empleando una aguja de calibre 27G (Braun Vetcare, S.A., Barcelona, España).

7. Sacrificio y obtención de muestras

Se establecieron tres puntos de sacrificio: D1, D7 y D14 tras la infusión celular, sacrificándose tres animales por grupo en cada uno de dichos puntos. Bajo anestesia profunda por vía inhalatoria (isofluorano; Abbot Laboratories, Chicago, Illinois, USA) y mediante punción cardíaca se recogió una muestra de sangre de cada animal en tubos con anticoagulante EDTA. Tras el sacrificio por dislocación cervical, recogimos implante de CO humana, hígado, cerebro, riñones y fémures. Los implantes de CO se dividieron en dos fragmentos. Uno fue fijado en PFA 4% (Panreac Química S.A.U, Barcelona España) para los posteriores análisis histológicos e inmunohistoquímicos, mientras que el otro fue almacenado a -80°C para posterior extracción de RNA y análisis de la expresión génica. Las muestras de hígado, cerebro y riñones se fijaron en PFA 4% (Panreac Química S.A.U, Barcelona España) para posteriormente analizar la presencia de células inyectadas en estos órganos. Por último, los fémures se recogieron con el fin de analizar la presencia en la médula ósea de las células inyectadas.

8. Localización de las células madre tras su infusión

La presencia de las células inyectadas en los implantes de CO humana, así como en los distintos órganos murinos recogidos se evaluó mediante tinción *Prussian blue* (HT20; Sigma-Aldrich, España), aprovechando su previo marcaje con MIRB. Para ello, en primer lugar, los implantes de CO y el resto de los tejidos fijados en PFA 4% se incluyeron en parafina y se cortaron tal y como se ha descrito con anterioridad (sección A, apartado 8.1.1). Tras desparafinar e hidratar las secciones histológicas, se realizó una tinción *Prussian Blue* siguiendo los pasos detallados en la sección B, apartado 10. Se analizaron un total de diez secciones de cada muestra (no sucesivas) bajo microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania), tomándose imágenes de cada una de las secciones mediante una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). En el caso de los implantes de CO, se cuantificó mediante el programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA) el número de células ováricas (teñidas de rosa) y el número de células inyectadas (células teñidas de azul), calculándose el porcentaje de células inyectadas como:

$$\frac{\text{nº células teñidas de azul}}{\text{nº total de células}} \times 100$$

9. Presencia en la médula ósea de los animales de las células madre inyectadas

Teniendo en cuenta que las células inyectadas (BMDSC y CD133+) residen en la médula ósea, decidimos analizar si tras su inyección eran capaces de migrar y establecerse en la médula ósea del huésped (ratón). Con dicho fin, tras limpiar bien los fémures recogidos en el sacrificio eliminando completamente los restos de grasa y músculo, se rompió cuidadosamente la epífisis proximal y la epífisis distal. A continuación, se pasaron por el interior de la diáfisis 500 μ L de DPBS (Biowest, Nuaille, France) con la ayuda de una aguja de calibre 30G, repitiendo este proceso un total de tres veces. La suspensión celular de médula ósea obtenida se centrifugó 10 min a 200g, descartándose el sobrenadante y guardándose el pellet (células) a -80°C hasta su uso.

La presencia en la médula femoral murina de células inyectadas (de origen humano), se analizó mediante una PCR convencional para el gen p53 humano, seguida de electroforesis capilar. En primer lugar, se extrajo el DNA de las células de la médula ósea femoral mediante el *QIAamp DNA blood mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, la calidad de las muestras se analizó amplificando el DNA mediante *primers* específicos para el gen mitocondrial hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (Hprt1, del inglés *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) de ratón (Hprt1-Fw, 5'-TCAGTCAACGGGGGAC-ATAAA-3'; Hprt1-Rv, 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3'). A continuación, las muestras de DNA de calidad se analizaron empleando los *primers* específicos para el exón 5 del gen p53 humano incluidos en el *Rearrangements Molecular Analysis kit* (Master Diagnóstica, Granada, España), siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos de PCR se evaluaron, posteriormente mediante electroforesis capilar [206]. En las muestras en las que no se detectó p53 humano, los productos de PCR se reanalizaron para asegurarse que la ausencia de amplicón fuese debida a la ausencia de células humanas y no a una baja calidad del DNA. Con dicho objetivo, estas muestras se sometieron a un segundo análisis de evaluación de la calidad del DNA mitocondrial (análisis del gen Hprt1 mediante PCR). La presencia de DNA mitocondrial de ratón (amplicón de Hprt1) unida a la ausencia de p53 humano se consideró como un resultado negativo para la presencia de células humanas, es decir, de células inyectadas.

10. Análisis de las poblaciones foliculares

10.1. Recuentos foliculares

Para realizar los recuentos foliculares, la primera de cada 10 secciones ováricas de 4 μm se tiñó con H&E y se analizó bajo microscopio óptico. Este criterio se estableció con el objetivo de contar todos los folículos presentes en las muestras, teniendo en cuenta que el tamaño de los folículos primordiales en humanos es de aproximadamente 40 μm . Los folículos se clasificaron de la siguiente forma: Foliculo primordial: ovocito rodeado por una capa de CG aplanadas; Foliculo primario: ovocito rodeado por una capa completa de CG cuboidales; Foliculo secundario: ovocito rodeado por dos o más capas de CG cuboidales; Folículos antrales: con cavidad antral y Folículos preovulatorios: de mayor tamaño, con un gran antro y con el ovocito en una esquina rodeado por las células del cúmulo. Con el fin de evitar el doble conteo de folículos primarios, secundarios, terciarios, antrales y preovulatorios sólo se consideraron los folículos morfológicamente normales con el núcleo del ovocito presente en la sección. Los resultados de los recuentos se expresaron como densidad folicular (n° folículos/ mm^3 de tejido ovárico) para facilitar el análisis y comparación de las muestras. Además, se calculó la proporción de cada población folicular respecto al total de folículos del implante.

10.2. Activación folicular

Se analizó mediante RT-qPCR la expresión de distintos genes de la ruta PI3K-Akt, debido a su implicación en la activación folicular. Concretamente, analizamos la expresión génica de *Akt* y *Foxo3a*. Para ello, en primer lugar, se extrajo el mRNA de los xenoimplantes ováricos almacenados a -80°C empleando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se sintetizó el cDNA mediante el *Advantage[®] RT-for-PCR Kit* (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) partiendo de 500 ng de RNA por muestra (ver sección B, apartado 13.1.1 y 13.1.2). La RT-qPCR se realizó empleando sondas Taqman[®] específicas para el *Akt1* humano (Hs00178289_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y para el *Foxo3 humano* (Hs00921424_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las mezclas de reacción de PCR se prepararon con 100 ng de cDNA en *1X Taqman Gene Expression Master Mix*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, las muestras se amplificaron empleando el *7900HT Fast PCR system* (Applied Biosystems, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Las condiciones de PCR consistieron en una activación inicial de la uracil-N-glicosilasa a 50°C durante 2 min, seguida de una activación de la AmpliTaq Gold a

95°C durante 10 min. A continuación, se realizaron 40 ciclos consistentes en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 min a 60°C. La expresión relativa se calculó mediante el método comparativo DDCT empleando como gen reportero el 18S humano (Hs99999901_s1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

11. Análisis del estroma ovárico

11.1. Evaluación histológica de la vasculatura en los implantes de CO

El análisis de la vascularización del estroma ovárico se realizó mediante una inmunohistoquímica frente a CD31 (marcador de células endoteliales).

Se seleccionaron un total de cuatro cortes histológicos por muestra, que se desparafinaron e hidrataron tal y como se ha explicado anteriormente (sección A, apartado 8.1.2). A continuación, con el objetivo de exponer los grupos enmascarados por el PFA, las secciones se incubaron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) en un microclavo, a una presión de 1.5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, se incubaron durante 15 min a TA con *Peroxidase-Blocking Solution* (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania), para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente, se lavaron con TBST (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD31 (JC70A, Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) a una dilución 1:20 durante 60 min. Para el marcaje con el anticuerpo secundario y revelado de la señal, se empleó el método *ENVISION* (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor. Más detalladamente, las muestras se incubaron durante 30 min a TA con un polímero marcado con peroxidasa conjugado con inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo de cabra en tampón Tris-HCl. Finalizada esta incubación, se reveló el marcaje añadiendo una solución cromogénica de DAB (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania), determinándose el tiempo apropiado de revelado bajo microscopio óptico. La señal de DAB se contrastó mediante una tinción suave con hematoxilina. Finalmente, las muestras se deshidrataron mediante pases por etanol y xilol y se montaron con medio Eukitt (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). Empleando un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) acoplado a una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania) se obtuvieron un total de cuatro imágenes por sección, que se cuantificaron mediante el programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA). La MVD se calculó como:

$$\frac{\text{área CD31 + (marrón)}}{\text{área total del tejido}} \times 100$$

Como control negativo del marcaje se empleó una sección ovárica incubada con la mezcla *ENVISION* (anticuerpo secundario), pero no con el anticuerpo primario, mientras que como control positivo se empleó una sección de amígdala humana.

11.2. Análisis de la vascularización en los implantes de CO mediante RT-qPCR

Además de evaluar la vascularización de los implantes ováricos mediante inmunohistoquímica, analizamos la expresión génica del marcador de células endoteliales *Cd31* mediante RT-qPCR. Concretamente, evaluamos la expresión génica del *Cd31* humano y del *Cd31* de ratón con el fin de discriminar entre vasos de origen humano (donante) y vasos de origen murino (huésped).

Para dicho análisis empleamos el mRNA extraído de los xenoimplantes ováricos mediante el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Tras sintetizar el cDNA tal y como se ha descrito anteriormente (sección C, apartado 10.2) se procedió a realizar una RT-qPCR empleando sondas Taqman® específicas para el *Cd31* murino (Mm01242576_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y para el *Cd31* humano (Hs01065282_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las mezclas de reacción de PCR se prepararon con 100 ng de cDNA en *1X Taqman Gene Expression Master Mix*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, las muestras se amplificaron empleando el *7900HT Fast PCR system* (Applied Biosystems, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Las condiciones de PCR consistieron en una activación inicial de la uracil-N-glicosilasa a 50°C durante 2 min, seguida de una activación de la AmpliTaq Gold a 95°C durante 10 min. A continuación, se realizaron 40 ciclos consistentes en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 min a 60°C. La expresión relativa se calculó mediante el método comparativo DDCT empleando como gen reportero el 18S (18S humano: Hs99999901_s1, 18S ratón: Mm03928990_g1; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

11.3. Evaluación de la proliferación celular en los implantes de CO

Para evaluar la proliferación celular en los implantes ováricos se realizó una inmunohistoquímica frente a Ki67. En primer lugar, las secciones ováricas (cuatro secciones representativas por muestra) se desparafinaron e hidrataron tal y como se detalla en la sección A, apartado 8.1.2. Posteriormente, se realizó el

desenmascaramiento antigénico en solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) a una presión de 1,5 Bar durante 3 min empleando un microclave (J.P Selecta). Una vez atemperadas, las secciones se incubaron durante 15 min a TA con *Peroxidase-Blocking Solution* (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente, se lavaron con TBST (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki67 (MIB-1, Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) a una dilución 1:100 durante 60 min a RT. La incubación con el anticuerpo secundario y el revelado de la señal, se realizó empleando el método *ENVISION* (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor (ver sección C, apartado 11.1). Tras contrastar la señal del DAB mediante una tinción suave con hematoxilina, las muestras se montaron con medio Eukitt (Sigma-Aldrich St. Louis MI), previa deshidratación mediante pases por etanol y xilol. Finalmente, se contaron bajo microscopio de campo claro Leica DMI 3000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) el número de células Ki67+ (aquellas con núcleo teñido de marrón) en las distintas secciones y se tomaron imágenes representativas de cada una de ellas mediante la cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). El área del tejido se cuantificó mediante el programa *Image J* (National Institute of Health), calculándose el porcentaje de proliferación como:

$$\frac{\text{nº de células Ki67} +}{\text{área total del tejido}} \times 100$$

Como control negativo del marcaje se empleó una sección ovárica incubada con la solución *ENVISION* (anticuerpo secundario), pero no con el anticuerpo primario, mientras que como control positivo se empleó una sección de endometrio humano proliferativo.

12. Determinación de los niveles séricos de estradiol

La producción de estradiol se determinó mediante el Estradiol EIA kit (Cayman Chemical Company, Michigan, US), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un ensayo de enlace competitivo que permite cuantificar el estradiol en plasma y en otras muestras como suero o medio de cultivo. Concretamente, este ensayo se basa en la competición entre el estradiol y un conjugado de estradiol-acetilcolinesterasa (AChE) por una cantidad limitada de estradiol antisuero (antisuero frente al estradiol obtenido en conejo). Puesto que la concentración del conjugado de AChE es constante mientras que

la concentración de estradiol varía entre muestras, la cantidad de AChE que se une al estradiol antisuero es inversamente proporcional a la concentración de estradiol en cada pocillo.

En nuestro caso, determinamos la concentración de estradiol en plasma. Este plasma lo obtuvimos centrifugando las muestras de sangre recogidas en el momento del sacrificio a 1600g durante 10 min a 4°C. ASe añadieron a los pocillos de la microplaca del kit (recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo) 50 µL de la muestra o estándar correspondiente, 50 µL de estradiol antisuero y 50 µL del conjugado estradiol-AChE, incubándose la placa durante 1 hora a TA y en agitación. Durante esta incubación el estradiol antisuero se une al anticuerpo monoclonal anti- IgG de conejo que recubre los pocillos de la placa, uniéndose a él las moléculas de estradiol presentes en la muestra y moléculas de AChE conjugadas a estradiol. Tras lavar la placa para eliminar cualquier reactivo no unido específicamente, los pocillos se incubaron con reactivo de Ellman (acetilcolina y ácido 2-nitrobenzoico) durante 1 hora a TA y en agitación. En esta incubación, la AChE convierte la acetilcolina en tiocolina, que reacciona con el ácido 2-nitrobenzoico dando lugar a un producto de color amarillo (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) con una elevada absorción a 412 nm. Finalmente, se leyó la absorbancia a 412 nm mediante un espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices, San José, CA, USA). La concentración de estradiol en cada muestra se calculó en base a la curva patrón obtenida y teniendo en cuenta que la absorbancia era proporcional a la cantidad del conjugado estradiol-AChE, e inversamente proporcional a la cantidad de estradiol presente en la muestra.

Cada muestra se ensayó por triplicado, calculándose la media de los replicados técnicos y expresando el resultado en pg/mL en concordancia con la curva patrón construida.

El límite de detección (LOD, del inglés *Limit Of Detection*) del ensayo fue de 20 pg/mL y la interferencia con otras hormonas esteroideas < 0.01%. Para 102,4 pg/mL, las variaciones intra- e inter- ensayo fueron de 13,0% y 8,2%, respectivamente.

13. Análisis transcriptómico mediante matrices basadas en RT-qPCR

13.1. Obtención del mRNA y síntesis del cDNA

Para realizar el análisis transcriptómico se partió del RNA extraído de los implantes de CO de D7 y D14. (sección C, apartado 10.2). Un vez extraído y cuantificado, se juntó el RNA de todas las muestras de la misma condición (500 ng/muestra), obteniéndose así un total de seis conjuntos o *pools* de RNA: Control-D7, BMDSC-D7, CD133-D7,

Control- D14, BMDSC-D14, CD133-D14. Seguidamente, se sintetizó el cDNA de cada uno de los *pools* de RNA empleando el *RT² First Strand Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, el RNA se incubó con tampón GE durante 5 min a 42°C para eliminar cualquier resto de DNA genómico residual y evitar así falsos positivos en la subsecuente matriz de PCR. A continuación, se preparó la mezcla de reacción con los reactivos del kit: tampón 5X BC3, control P2, mezcla de enzimas de síntesis de cDNA, inhibidor de RNasas y agua libre de nucleasas en un volumen final de 10 µL. La mezcla de reacción se añadió a 10 µL de RNA libre de DNA, y se incubó en un termociclador durante 30 min a 42°C y, posteriormente, 5 min a 95°C para parar la reacción de síntesis. El cDNA obtenido en cada reacción se diluyó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 111 µL.

13.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

La expresión génica en cada condición se analizó empleando tres *RT² Profiler Arrays* (Qiagen, Hilden, Alemania): PAHS-040ZC (*Human EGF/PDGF Signaling Pathway*), PAHS-041ZC (*Human Growth Factors*) y PAHS-072ZC (*Human Angiogenic Growth Factors*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada una de estas matrices incluye *primers* para el análisis de 84 genes de interés (Tabla 3), así como 5 genes reporteros, un control de contaminación por DNA genómico, un control de la síntesis de cDNA (en triplicado) y un control positivo de la reacción de PCR (en triplicado) (Figura 25).

Brevemente, se mezclaron 102 µL de cDNA con 2X *RT² SYBR Green Mastermix* (Qiagen, Hilden, Alemania) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 2.550 µL. A continuación, esta mezcla se añadió a una microplaca de 96 pocillos, pipeteando 25 µL en cada pocillo. El cDNA se amplificó mediante el *StepOnePlus Real-Time PCR system* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Spain). Las condiciones de PCR consistieron en una activación inicial de la enzima polimerasa mediante una incubación de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos consistentes en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 min a 60°C. La fluorescencia se registró al final de cada uno de estos 40 ciclos.

Tabla 3. Genes incluidos en los RT2 Profiler Arrays (placa 96 pocillos, formato C).

PAHS-040ZC		PAHS-041ZC		PAHS-072ZC	
ACTR2	KRAS	AMH	IL10	AGGF1	IFNG
AKT1	LTA	BDNF	IL11	AMOT	IL10
AKT2	MAP2K1	BMP1	IL12B	ANG	IL12A
AKT3	MAP2K4	BMP10	IL18	ANGPT1	IL12B
ARAF	MAP2K7	BMP2	IL1A	ANGPT2	IL17F
ATF1	MAP3K2	BMP3	IL1B	ANGPTL1	IL6
ATF2	MAPK1	BMP4	IL2	ADGRB1	CXCL8
BAD	MAPK10	BMP5	IL3	BMP2	KL
BCAR1	MAPK3	BMP6	IL4	BTG1	KLK3
BCL2	MAPK8	BMP7	INHA	CCL15	LEP
BRAF	MAPK9	BMP8B	INHBA	CCL2	MDK
CASP3	MKNK1	CECR1	INHBB	CD55	NPPB
CASP9	MMP7	CLC	JAG1	CD59	NPR1
CBL	NCK2	CSF1	JAG2	CHGA	PDGFB
CCND1	NFATC3	CSF2	LEFTY1	COL18A1	PDGFD
CHUK	NFKB1	CSF3	LEFTY2	COL4A3	PF4
COL1A1	NRAS	CSPG5	LIF	CSF3	PGF
CREB1	NUP62	CXCL1	LTBP4	CXCL10	PLG
CSNK2A1	PDGFA	DKK1	MDK	CXCL11	PPBP
CSNK2B	PDGFB	ERAP1	MSTN	CXCL12	PRL
DUSP1	PDGFRA	EREG	NDP	CXCL13	PROK1
DUSP6	PDPK1	FGF1	NGF	CXCL14	PTN
EGF	PIK3CA	FGF11	NODAL	CXCL2	RHOB
EGFR	PIK3R1	FGF13	NRG1	CXCL3	RNH1
EGR1	PIK3R2	FGF14	NRG2	CXCL5	RUNX1
EIF4E	PLAT	FGF17	NRG3	CXCL6	SERPINC1
ELK1	PLCG1	FGF19	NRTN	CXCL9	SERPINE1
EPS8	PPP2CA	FGF2	NTF3	EDIL3	SERPINF1
FASLG	PRKCA	FGF22	OSGIN1	EREG	SPINK5
FN1	PTEN	FGF23	PDGFC	FGF1	STAB1
FOS	RAF1	FGF5	PGF	FGF13	TGFA
FOXO3	RAP1A	FGF6	PSPN	FGF2	TGFB1
GAB1	RASA1	FGF7	PTN	FGFBP1	THBS1
GRB2	RHOA	FGF9	SLCO1A2	FIGF	TIE1
GSK3A	RPS6KA5	FIGF	SPP1	FN1	TIMP1
GSK3B	RPS6KB1	GDF10	TDGF1	FOXO4	TIMP2
HBEGF	SHC1	GDF11	TGFB1	FST	TIMP3
HRAS	SRC	GDNF	THPO	GRN	TNF
IKKB	STAT1	GPI	TNNT1	GRP	TNNI2
IL2	STAT3	HBEGF	TYMP	HGF	TNNI3
JAK1	STAT5A	IGF1	VEGFA	IFNA1	TYMP
JUN	TP53	IGF2	VEGFC	IFNB1	VEGFA

PAHS-040ZC: ruta de señalización EGF/PDGF de humano; PAHS-041ZC: factores de crecimiento humanos; y PAHS-072ZC: factores de crecimiento angiogénicos humanos.

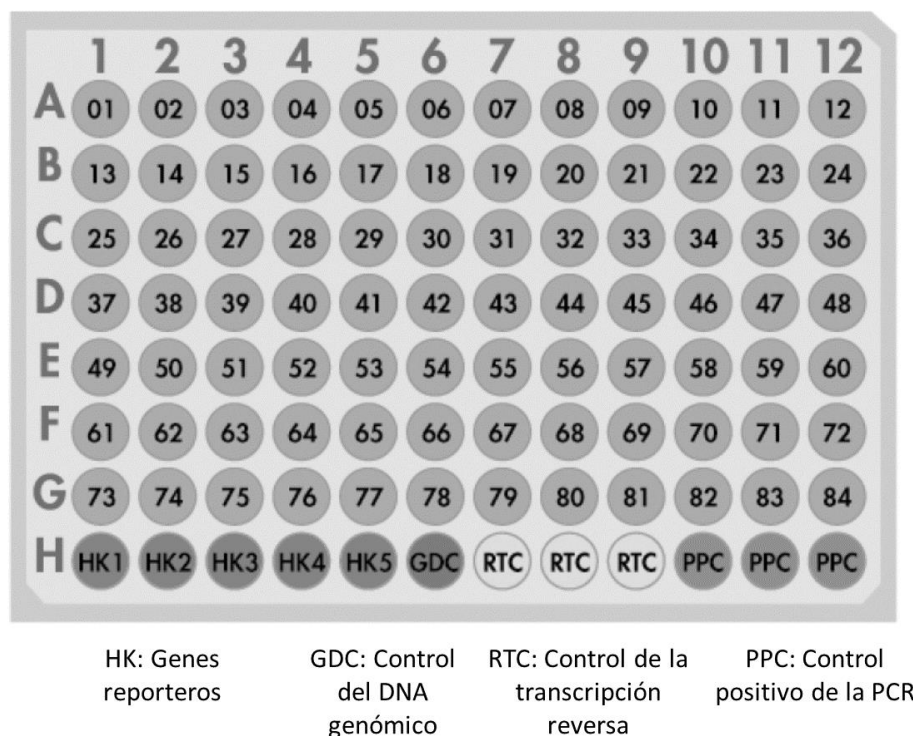


Figura 25. Esquema de un RT2 Profiler Array (placa de 96 pocillos, formato C). Cada placa contiene primers para el análisis de 84 genes de interés (posición A01-G12) así como para 5 genes reporteros: beta actina (ACTB), beta 2 microglobulina (B2M), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) y proteína ribosomal grande P0 (RPLP0) y distintos controles positivos y negativos.

13.3. Normalización de los datos

Los datos obtenidos de los *RT² Profiler Arrays* se procesaron utilizando el software *StepOne v2.3* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Para poder comparar la expresión génica entre condiciones, se estableció el mismo umbral de fluorescencia (*threshold*) en todas las muestras analizadas con un mismo *RT² Profiler Array* (PAHS-040ZC, PAHS-041ZC o PAHS-072ZC). A continuación, se calculó la expresión relativa basándose en el método DDCT, empleando la herramienta de análisis de la página web de Qiagen. De los distintos genes reporteros, se seleccionaron aquellos que presentaban una menor variación entre condiciones. Una vez seleccionados, se realizó una normalización manual empleando la media geométrica de los mismos. Decidimos emplear la media geométrica de los genes reporteros basándonos en la investigación del Dr. Vandesompele, en la que se demostró que era más preciso realizar una normalización empleando la media geométrica que empleando la media aritmética [207]. Los genes reporteros elegidos fueron los mismos para todas las matrices de RT-qPCR: actina beta (ACTB) e hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1).

13.4. Filtración de los datos de baja calidad

Antes de proceder con el análisis bioinformático de los datos obtenidos, se descartaron los genes con un valor de cambio (fc, del inglés *fold-change*) de baja calidad, es decir, no fiable. Esta filtración se realizó basándose en las cuatro categorías de calidad establecidas por la herramienta web de análisis de Qiagen:

- Sin comentarios, cuando los valores del ciclo umbral (Ct, del inglés *cycle threshold*) en todas las muestras se encontraban dentro del intervalo de confianza
- Comentario A, cuando el Ct era relativamente alto (>30) en una de las muestras y relativamente bajo en la otra (<30)
- Comentario B, cuando el Ct del gen era relativamente alto (>30) en ambas muestras, indicando una baja expresión del gen en ambas.
- Comentario C, cuando el Ct en ambas muestras fue no determinado o superior al valor de corte establecido (ciclo 35), indicando ausencia de expresión o expresión indetectable del gen.

Los genes con un fc con comentario B o C se eliminaron de los subsiguientes análisis al no ser fiables. La intersección entre los genes válidos en las distintas comparaciones dio un total de 100 genes fiables, que son los que empleamos en el posterior análisis bioinformático.

13.5. Análisis bioinformático

13.5.1. Análisis de Componentes Principales

Con el objetivo de reducir la dimensionalidad y comparar condiciones, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) empleando lenguaje estadístico R (R Core Team, 2016) [208].

13.5.2. Test de proporciones de Fischer

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de genes up- y down-regulados entre los distintos tratamientos (BMDSC y CD133) y tiempos de análisis (D7 y D14 tras la infusión celular) aplicamos una prueba exacta de Fischer empleando lenguaje R. Los resultados se representaron en tablas de contingencia, considerándose las diferencias en las proporciones estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

13.5.3. Análisis funcional

Con el fin de analizar las implicaciones funcionales de los genes afectados en la fisiología ovárica se llevaron a cabo dos aproximaciones:

1. Se analizaron funciones de interés en el desarrollo folicular clasificándose manualmente los 100 genes en una de las siguientes funciones teniendo en cuenta sus términos GO validados experimentalmente y propagados a lo largo de la ontología (*releases/2017-03-31*): 1) Vascularización, 2) Proliferación, 3) apoptosis, 4) Otra. A continuación, se estimó para cada condición experimental (BMDSC-D7, CD133-D7, BMDSC-D14 y CD133-D14) la magnitud del efecto transcriptómico sobre los procesos de vascularización y proliferación calculándose el porcentaje de genes regulados involucrados en estos procesos respecto al total de genes regulados.
2. Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional (ORA, del inglés *Over-Representation Analysis*) [209] utilizando la herramienta web STRING (versión 11.0) [210] para determinar qué rutas génicas eran reguladas por los distintos tratamientos, . Este análisis ORA se basó en la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG, del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [211]. Los resultados representando rutas génicas generales y enfermedades se eliminaron de la tabla final de enriquecimiento. Se compararon las rutas KEGG enriquecidas exclusivamente tras el tratamiento con BMDSC con aquellas enriquecidas tras ambos tratamientos celulares.

14. Análisis estadístico

Los resultados se representaron como media \pm desviación estándar. Las comparaciones entre los tres grupos experimentales (Control, BMDSC y CD133) se realizaron aplicando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis mediante el software SPSS 22.0 (IBM, Somers, NY, USA). A continuación, se realizaron comparaciones dos a dos aplicando el Mann-Whitney U-test. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

D) MECANISMO PARACRINO EN LA REGENERACIÓN OVÁRICA INDUCIDA POR BMDSC

1. Diseño experimental

Para analizar la importancia del mecanismo paracrino en el rescate folicular y la regeneración ovárica inducida por las BMDSC, se emplearon las muestras de plasma de aféresis y parte de los resultados clínicos del estudio piloto llevado a cabo por nuestro grupo con 17 pacientes PR. Este estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIM 2014/0147) y registrado en *Clinical Trials*: NTC02240342. Todas las participantes aceptaron voluntariamente entrar en dicho estudio y firmaron el consentimiento informado en cuestión. El estudio consistió en la movilización de BMDSC a sangre periférica mediante un tratamiento con G-CSF y posterior recolección mediante aféresis. Las células de la aféresis se infundieron, a continuación, en el interior de la arteria ovárica de uno de los ovarios mediante cateterismo intraarterial. Tras dicho procedimiento, se monitorizaron durante 5 meses los niveles séricos de AMH y el AFC mediante ecografía transvaginal. Se analizaron en el plasma de la aféresis la concentración de determinados factores solubles mediante ELISA, analizándose su asociación y/o correlación con el incremento en los biomarcadores de reserva ovárica (AMH y AFC) tras el tratamiento.

2. Movilización de las BMDSC, aféresis e infusión

La movilización de las células madre y la aféresis se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección B, apartado 2. Tras la caracterización de las poblaciones celulares mediante citometría (sección B, apartado 3), se preparó para la aféresis un volumen de aféresis tal que en él hubiese 50×10^6 células CD133+. La infusión se realizó en la Unidad de Radiología Vascular e Intervencionista del Hospital Universitario y Politécnico La Fe mediante un sistema de angiografía digital y empleando la técnica de Seldinger.

3. Seguimiento de las pacientes

En todas las pacientes, se registró el AFC así como los niveles séricos de AMH en condiciones basales antes de la movilización mediante G-CSF. Tras la infusión de las BMDSC, ambos biomarcadores de reserva ovárica se analizaron cada dos días durante las primeras dos semanas, una vez por semana durante cuatro semanas y, mensualmente hasta los cinco meses. Se consideró arbitrariamente una respuesta positiva al tratamiento cuando las pacientes presentaron a lo largo del período de seguimiento un incremento

en el AFC ≥ 3 folículos respecto al valor basal y/o un incremento respecto al valor basal de 2 veces la desviación estándar y durante al menos dos días consecutivos en los niveles de AMH.

Para la determinación de los niveles séricos de AMH se recogió una muestra de sangre periférica en tubo BD Vacutainer® con activador de coagulación y silicón (BD Diagnósticos, España). Una vez coagulada, se centrifugó a 1600g durante 15 min a 4°C. Tras separar el suero, se analizaron los niveles de AMH mediante el *System Cobas Elecsys 2010 AMH ELISA assay* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección del ensayo fue de 0,07 pmol/L y la variación interensayo de 3,8 %. Dicho análisis fue realizado por el laboratorio general de la clínica IVI-RMA Valencia.

Por otro lado, el AFC se determinó en la Unidad de Ginecología y Reproducción Asistida del Hospital Universitario y Politécnico la Fe mediante ecografía transvaginal utilizando un *GE iVoluson* (General Electric, Boston, MA, USA) equipado con una sonda vaginal tridimensional (6.5-9 MHz). Cada folículo se contó independientemente, midiendo su eje longitudinal y transversal. Se definió como folículo antral cualquier imagen anecoica de 2 a 10 mm dentro del parénquima ovárico.

4. Cuantificación de los factores solubles secretados por las BMDSC en el plasma de la aféresis

Cuantificamos mediante ELISA y ELISA multiplex la concentración en el plasma de la aféresis de determinados factores solubles secretados por las BMDSC y que podrían tener un papel en los efectos regenerativos de estas células en el ovario. Concretamente analizamos los niveles de KL, trombospondina 1 (THSP-1, del inglés *Thrombospondin 1*), IGF-1, interleuquina 11 (IL-11), BMP-6, FGF-2, TNF α y PDGF-BB.

4.1. Obtención del plasma

Se recogió una alícuota de la aféresis en tubo BD Vacutainer® con EDTAK₂ (BD Diagnósticos, España) y se aisló el plasma mediante una centrifugación de 10 min a 1600g 4°C. El plasma obtenido se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.2. Análisis de KL, THSP-1, IGF-1, IL-11 y BMP-6 mediante ELISA

Los niveles de KL, THSP-1, IGF-1, IL-11 y BMP-6 se analizaron mediante los kits *Human SCF Immunoassay Quantikine ELISA*, *Human Thrombospondin-1 Quantikine ELISA*, *IGF-I Quantikine ELISA*, *Human IL-11 Quantikine ELISA* (R&D Systems

Europe, Abingdon, UK) y *BMP-6 Human ELISA* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), respectivamente. En todos los casos se siguió el protocolo del fabricante. La determinación de KL, IGF-1, IL-11 y BMP-6 se realizó sin diluir las muestras, mientras que la concentración de THSP-1 se analizó diluyendo las muestras en el rango 1:2-1:50. En el caso del ensayo de IGF-1 se pretrataron las muestras con solución de disociación ácida para liberar este factor de las proteínas unidas al mismo.

Brevemente, se añadieron 100 μ L de cada estándar y muestra de plasma a una microplaca de 96 pocillos recubiertos con anti-KL humano, anti-THSP-1 humano, anti-IGF-1 humano, anti-IL-11 humano o anti-BMP-6 humano, respectivamente. Tras incubar la placa a TA durante 2 horas, se realizaron tres lavados y se añadió a los pocillos un anticuerpo secundario policlonal específico para el factor soluble de interés conjugado con peroxidasa, realizando una incubación de 2 horas a TA. A continuación, se lavaron los pocillos y se añadió una solución sustrato con peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina, incubando la placa durante 30 min en oscuridad. La reacción colorimétrica se paró mediante una solución 2N de ácido sulfúrico. Finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm mediante el espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular Devices, San José, CA, USA). La concentración se calculó extrapolando el valor de absorbancia de las muestras en la curva patrón generada a partir de los estándares. Cada muestra de plasma, así como cada estándar, se ensayó por duplicado, calculándose posteriormente la media de los duplicados y expresándose los resultados en ng/mL o pg/mL en función de la curva patrón establecida. En la tabla 4 se indica el LOD y las variaciones intra- e inter- ensayo de cada uno de los kits.

4.3. Análisis de FGF-2, PDGF-BB y TNF- α mediante ELISA multiplex

La concentración de FGF-2, PDGF-BB y TNF- α se determinó mediante un único ensayo empleando la tecnología *Procartaplex* (Affymetrix ebioscience). Esta tecnología permite detectar en una única lectura distintas moléculas de interés gracias al empleo de partículas magnéticas con una firma espectral única conjugadas a anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de interés (Figura 26).

Tabla 4. Límite de detección (LOD) y variaciones intra- e inter- ensayo de cada uno de los ensayos de ELISA realizados.

Ensayo	LOD	Variación intraensayo	Variación interensayo
KL	9,000 ng/mL	3,3 %	7,1 %
THSP-1	0,355 ng/mL	6,4 %	5,9 %
IGF-1	0,026 ng/mL	4,0 %	8,0 %
IL-11	8,000 pg/mL	4,7 %	6,3 %
BMP-6	150 pg/mL	<10%	<12%

En la presente tesis doctoral empleamos los kits *ProcartaPlex Human FGF-2*, *PDGF-BB* y *TNF alpha Simplex kits* (Affymetrix ebioscience, LabClinics S.A., Barcelona, Spain), siguiendo el protocolo del fabricante. Todas las muestras de plasma se ensayaron por duplicado y sin diluir. En primer lugar, los pocillos de una microplaca de 96 se recubrieron con tres tipos de partículas magnéticas, cada una de ellas con una firma espectral diferente: partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo anti-FGF-2, partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo anti-PDGF-BB y partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo anti-TNF- α . A continuación, se añadieron 25 μ L de cada uno de los estándares y de las muestras, incubando la placa 2 horas a TA y en agitación (500 rpm). Tras varios lavados empleando un *Hand-Held Magnetic Plate Washer* (Affymetrix ebioscience, LabClinics S.A., Barcelona, Spain) para retener las partículas magnéticas en la placa, se añadió una mezcla de anticuerpos secundarios biotinilados (anti-FGF-2, anti-PDGF-BB y anti-TNF- α) y la placa se incubó durante 30 min a TA en agitación (500 rpm). Tras una serie de lavados sucesivos para eliminar los excesos de anticuerpo secundario, se realizó una última incubación con moléculas de estreptavidina marcadas con el fluoróforo PE durante 30 min a TA y en agitación (500 rpm). Finalmente, se añadió el tampón de lectura y se leyó la placa empleando un equipo Luminex 100/200 (Luminex Corporation, Texas, USA). Los resultados se analizaron mediante el software *ProcartaPlex Analyst 1.0* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

El límite de cuantificación para FGF-2, PDGF-BB y TNF- α fue de 4,90 pg/mL, 732 pg/mL y 8,54 pg/mL, respectivamente.

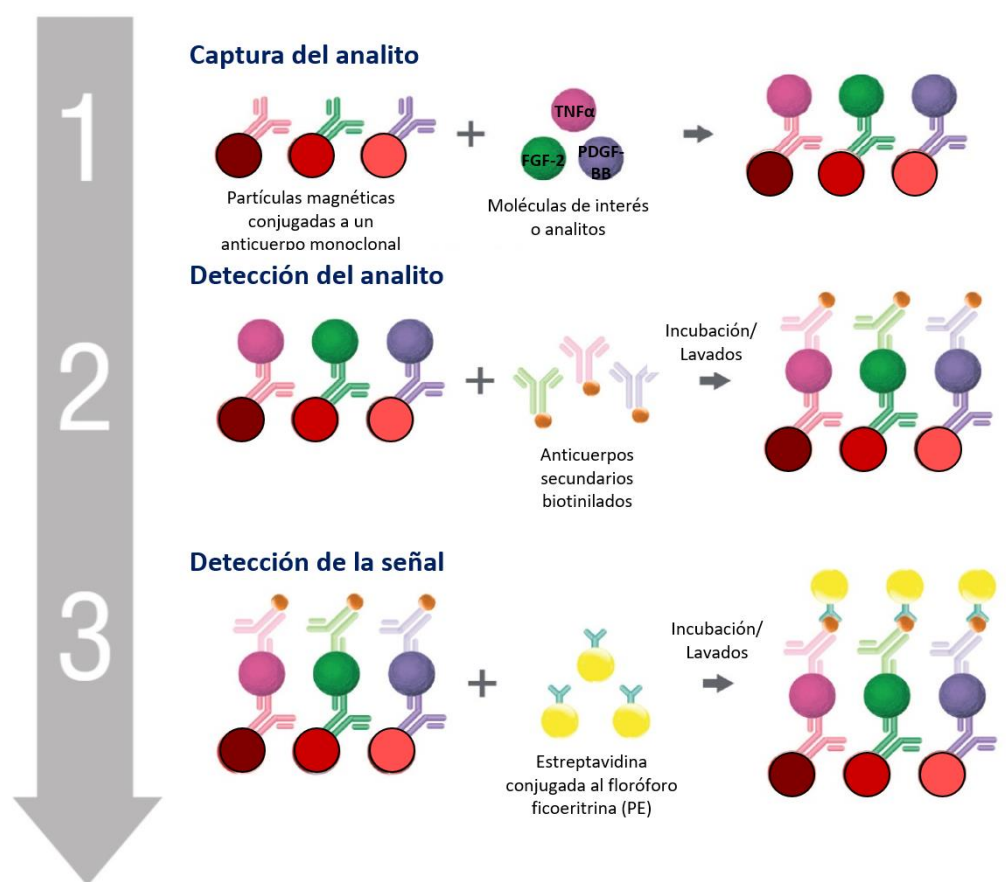


Figura 26. Esquema de la tecnología Procartaplex (Affymetrix ebioscience). Esta tecnología se basa en el empleo de partículas magnéticas con una firma espectral única conjugadas a anticuerpos monoclonales frente a la molécula o analito de interés (en nuestro caso FGF-2, TNF α y PDGF-BB). Gracias a que cada una de las partículas magnéticas posee una firma espectral diferente, es posible en una misma lectura identificar a qué molécula corresponde la señal. Modificada de la página web labclinics.com.

5. Análisis estadístico

Se empleó una prueba no paramétrica Mann-Whitney para analizar si existían diferencias en la concentración de los distintos factores solubles analizados entre aquellas pacientes en las que se incrementó el AFC y/o la AMH tras la infusión de las BMDSC. Por otro lado, se aplicó una correlación de Sperman, para evaluar la asociación entre los niveles de los distintos factores solubles y el incremento en el AFC o en los niveles de AMH tras la infusión celular. Todos los análisis se realizaron empleando el programa SPSS 22.0 (IBM, Somers, NY, USA), considerándose

estadísticamente significativos aquellos valores de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

VI. RESULTADOS

A) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI INDUCIDOS POR QUIMIOTERAPIA

1. Efectos sistémicos de la administración de quimioterapia: estado de salud general, peso corporal y tasa de supervivencia

Inmediatamente después de la administración de quimioterapia, se observaron efectos secundarios tanto en las ratonas del modelo DOR como en las del modelo POI. Entre ellos, cabe destacar piloerección, ojos cerrados, postura encorvada y reducción de la actividad. En las hembras DOR, estos efectos se observaron solo hasta aproximadamente 24 horas después de la quimioterapia. Por el contrario, en las POI estos síntomas fueron más severos y de mayor duración, extendiéndose durante 2-3 días. A partir de dicho momento, no se observó en ninguno de los modelos síntoma alguno de dolor o de alteración del estado de salud general.

Además de las alteraciones en el estado de salud general, también registramos una reducción significativa del peso corporal tras la quimioterapia. Al igual que el resto de los efectos secundarios mencionados, esta reducción en el peso corporal fue más moderada en el modelo de DOR que en el de POI (Control: $0,5 \pm 0,7\%$; DOR: $-5,1 \pm 3,3\%$; POI: $-13,8 \pm 1,7$; $p=0,04$ y $p=0,021$ respecto al control, respectivamente; $p=0,046$ entre ambos modelos). Las hembras DOR recuperaron rápidamente su peso inicial, detectándose solo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en D1. Por el contrario, en el modelo POI dicha recuperación fue más lenta y prolongada siendo las diferencias respecto al grupo estadísticamente significativas desde D1 hasta D20 (Figura 27A).

En cuanto a la tasa de supervivencia, en el modelo DOR, el 100% de los animales sobrevivió tras la administración de la quimioterapia (15 de 15). Por el contrario, tres ratonas tratadas con la dosis elevada de quimioterapia murieron durante los primeros 3 días tras su administración, siendo la tasa de supervivencia en dicho modelo (POI) del 80% (12 de 15). Pese a ello, el análisis Kaplan-Meier de la supervivencia animal no reveló diferencias estadísticamente significativas entre modelos, ni entre ninguno de los modelos y el grupo control (en el que la tasa de supervivencia fue también del 100%) (Figura 27B).

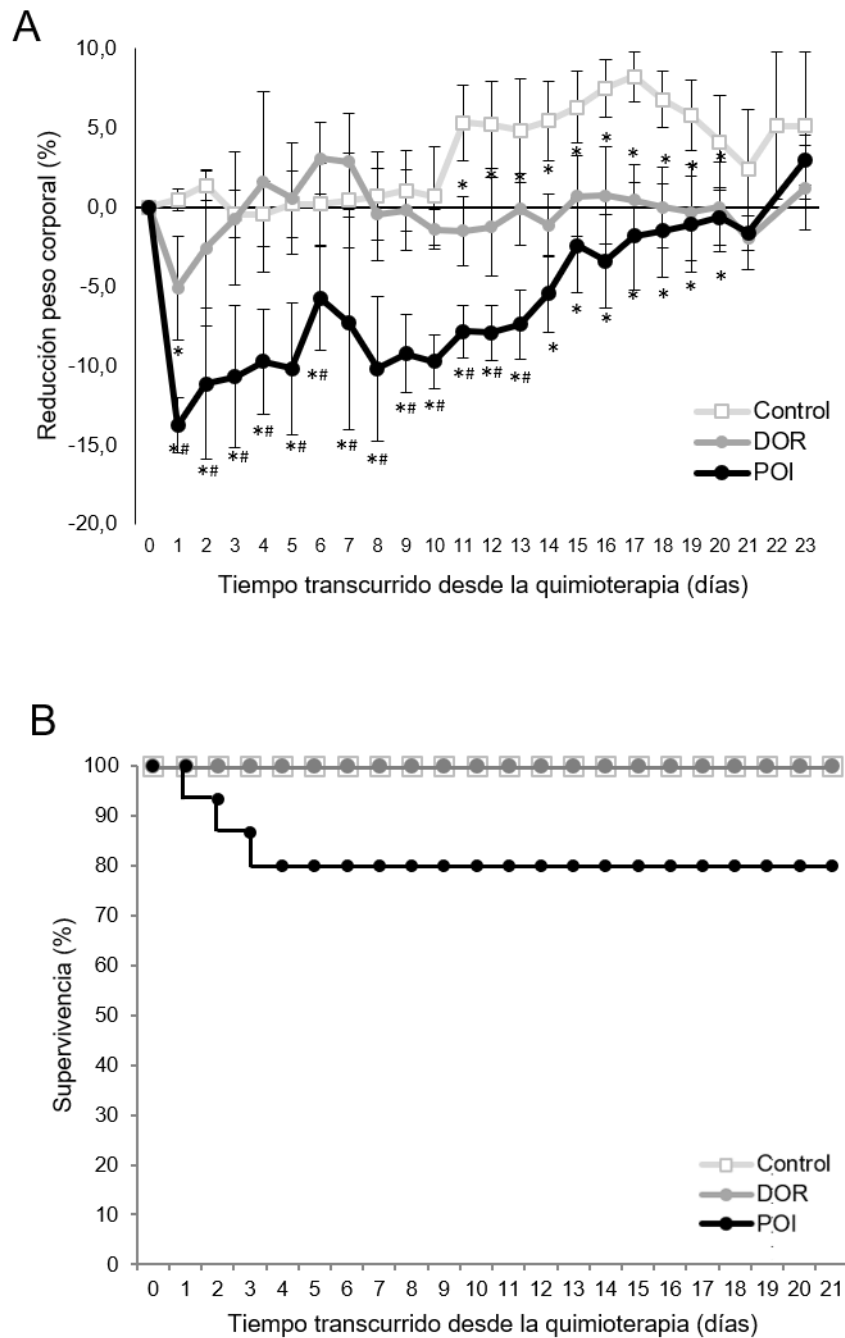


Figura 27. Efectos sistémicos de la administración de quimioterapia. A) Monitorización del peso corporal de los animales a lo largo del experimento (n=15/grupo). La quimioterapia provocó un descenso significativo en el peso corporal en ambos modelos de daño ovárico, especialmente detectable un día después del tratamiento. Esta pérdida fue significativamente superior (3 veces) en los animales POI que en los DOR ($p=0,046$). B) Representación Kaplan-Meier de la supervivencia en los distintos grupos experimentales (n=15/grupo). Ningún ratón de los grupos control y DOR murió tras la administración de la quimioterapia. Por el contrario, un 20% de los ratones del grupo POI (3 de 15) murieron tras el tratamiento. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. * $p<0,05$ vs. grupo control. # $p<0,05$ vs. grupo DOR. Adaptada de Buigues *et al.*, 2019 [212].

Pese a los efectos sistémicos observados tras la quimioterapia, en el momento de la estimulación ovárica no observamos diferencias entre las hembras control, las DOR y las POI en cuanto al estado de salud general, el comportamiento y el peso corporal. En concordancia con este resultado, en la necropsia realizada tras el sacrificio no se observó ninguna alteración macroscópica ni ninguna diferencia entre las hembras DOR/POI y las controles.

2. Evaluación del tamaño y peso ovárico tras la estimulación

Al analizar el tamaño ovárico tras la estimulación, observamos que en ambos modelos los ovarios eran de menor tamaño que los del grupo control. Esta reducción fue menos severa en el modelo DOR que en el POI, tal y como se puede observar en la Figura 28A. Esta misma tendencia se observó al analizar el peso ovárico. Concretamente, en el modelo de daño ovárico severo (POI) se detectó una reducción de 5 veces respecto al grupo control en el peso ovárico, mientras que en el modelo DOR el peso ovárico se redujo 2,4 veces (Control: $45,7 \pm 2,0$ mg; DOR: $18,8 \pm 2,3$ mg; POI: $9,0 \pm 3,8$ mg, $p=0,034$ en ambos casos).

A continuación, con el objetivo de descartar que las diferencias registradas en el peso ovárico fuesen consecuencia de diferencias en el peso corporal, se calculó la ratio peso ovárico/peso corporal de los animales en el momento del sacrificio (mg/g). Esta ratio fue estadísticamente menor en ambos modelos de daño ovárico en comparación con el grupo control ($p=0,032$ en ambos casos). Además, en concordancia con el resultado del peso ovárico, la reducción en la ratio fue menos severa en el modelo DOR ($p=0,021$ vs. modelo POI) (Figura 28B).

3. Efectos sobre el ciclo estral

En ambos modelos de daño ovárico se detectaron alteraciones en el ciclo estral tras el tratamiento quimioterapéutico. Concretamente, tanto en el modelo DOR como en el modelo POI, se observó un arresto del ciclo estral en la fase no receptiva de diestro (Figura 29A). En el modelo DOR este arresto fue precedido y, tal vez, explicado por un alargamiento progresivo en las fases del ciclo estral. De hecho, la duración del ciclo en las ratonas DOR fue dos veces mayor que en las del grupo control (Control: 6 ± 1 ; DOR: 12 ± 2 días; $p=0,046$). En el modelo POI, la detención del ciclo estral ocurrió mucho antes que en el modelo DOR (DOR: 12 ± 1 ; POI: 8 ± 1 , $p=0,04$) y no fue precedido por un alargamiento en las fases del ciclo.

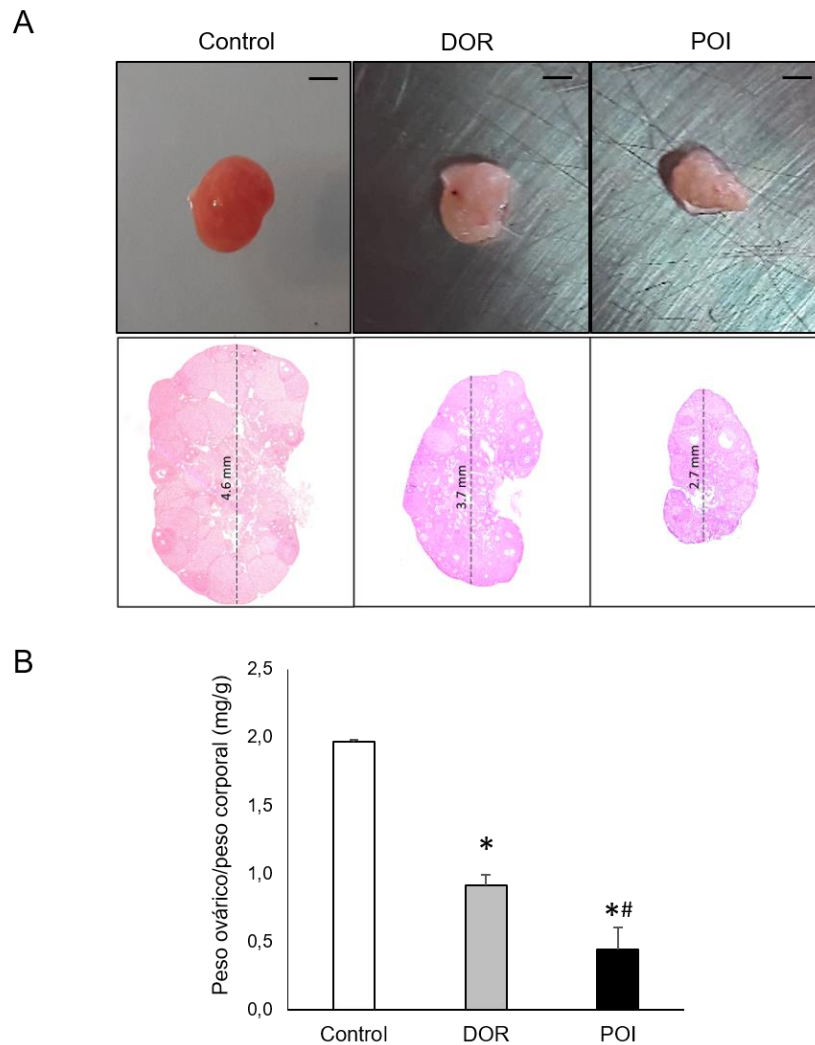
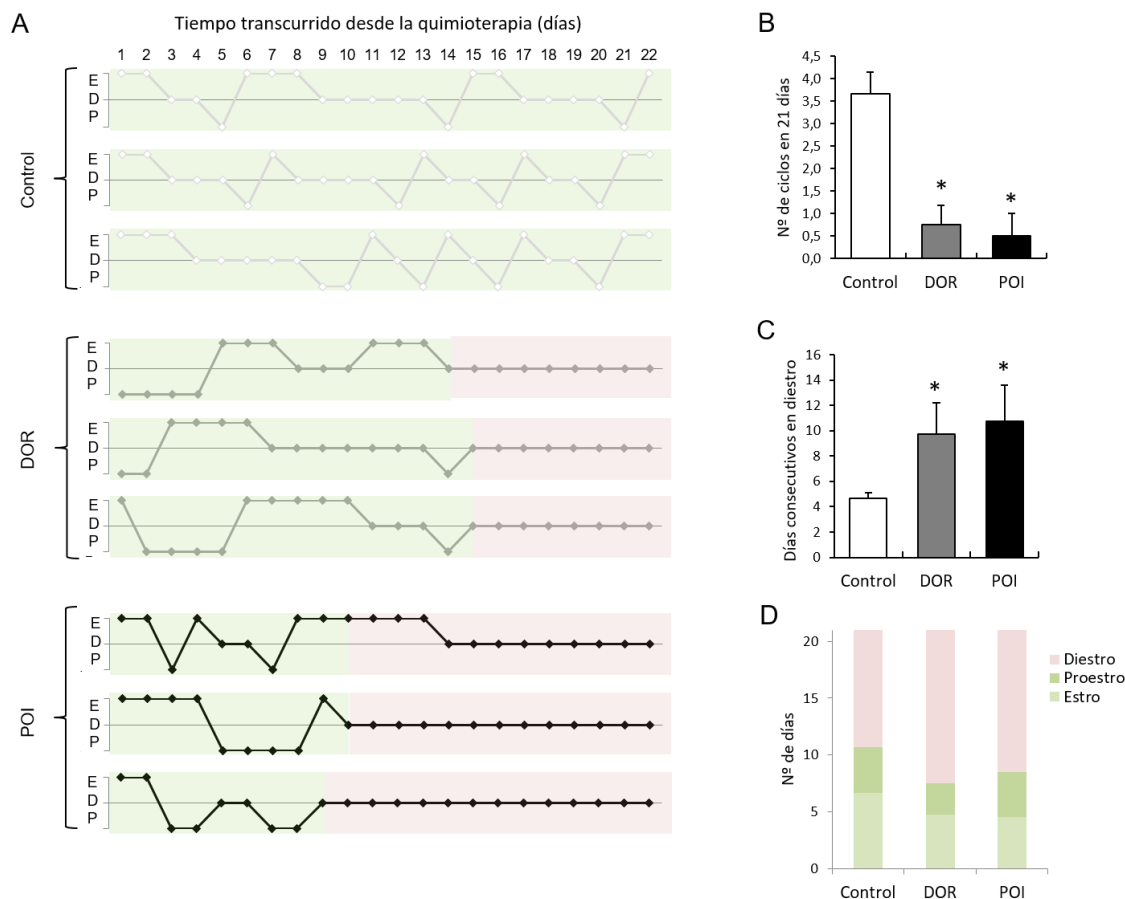


Figura 28. Tamaño y peso ovárico en los modelos de daño ovárico. A) Imágenes macroscópicas de los ovarios de los distintos grupos experimentales (arriba) y sección histológica central de los ovarios (establecida considerando el número total de secciones de cada ovario) teñida con hematoxilina eosina (abajo). Barras de escala=1mm. B) Peso ovárico normalizado respecto al peso corporal (n=4/grupo). El tamaño y el peso ovárico se redujeron de forma dosis- dependiente con la administración de quimioterapia. * $p < 0,05$ vs. grupo control. ** $p < 0,05$ vs. grupo DOR. Adaptada de Buigues *et al.*, 2019 [212].

A lo largo de los 21 días de monitorización, las ratonas control completaron un total de 4 ± 1 ciclos (Figura 29B), viéndose reducido dicho parámetro en ambos modelos de daño ovárico (DOR vs. Control $p = 0,026$ y POI vs. Control $p = 0,029$). Además, tanto en el modelo de DOR como en el de POI se detectó un incremento estadísticamente significativo en el número de días consecutivos en diestro (Figura 29C; $p = 0,031$ y $p = 0,032$ vs. grupo control, respectivamente), llegando a representar el tiempo pasado en dicha fase del ciclo estral un $59,5 \pm 11,9\%$ del período de monitorización en el modelo de POI (Figura 29D).



4. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo

4.1. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular

Al analizar el número total de folículos, observamos una reducción significativa en ambos modelos de daño ovárico en comparación con el grupo control ($p=0.034$ en ambos casos). La depleción folicular fue, no obstante, mayor en los ovarios de la condición de POI que en los de la de DOR (83% vs. 33%, $p=0.021$) (Figura 30A). Aunque todas las poblaciones foliculares se redujeron con la quimioterapia (Figura

30B), la población folicular más afectada en ambos casos fue la de los folículos primordiales. De hecho, se detectó una reducción del 55% en el modelo DOR y del 97% en el modelo POI (Figura 30B). Menor reducción se detectó en el número total de folículos en crecimiento (primarios, secundarios, terciarios, antrales y preovulatorios), siendo de un 29% en el modelo DOR y de un 70% en el POI. Además, detectamos un incremento dosis dependiente en la tasa de folículos en crecimiento/folículos durmientes en los modelos de DOR y POI respecto al grupo control (Control: $5,6 \pm 1,2$; DOR: $8,9 \pm 1,5$; POI: $97,0 \pm 44,6$; $p=0,034$).

Al comparar ambos modelos de daño ovárico, observamos que los folículos primordiales eran prácticamente inexistentes en el modelo POI, pero no en los ovarios de las hembras DOR (DOR: $88,0 \pm 27,4$ folículos; POI: $0,75 \pm 1,5$ folículos; $p=0,018$). Al igual que para la población de folículos durmientes, también se detectaron diferencias entre modelos en el número de folículos primarios (DOR: $491,0 \pm 84,7$; POI: $183,5 \pm 159,0$ folículos; $p=0,025$), secundarios (DOR: $154,8 \pm 72,0$; POI: $6,3 \pm 1,7$ folículos; $p=0,021$), terciarios (DOR: $52,8 \pm 8,7$; POI: $11,8 \pm 4,7$ folículos; $p=0,020$), y antrales (DOR: $45,8 \pm 9,4$; POI: $16,0 \pm 10,6$ folículos; $p=0,020$) (Figura 30B).

Por otro lado, analizamos el número y porcentaje de folículos morfológicamente anormales. Aunque se detectaron anomalías foliculares en todos los grupos, el porcentaje de folículos morfológicamente anormales en ambos modelos fue estadísticamente superior al del grupo control (Control: $0,83 \pm 0,42$ %; DOR: $10,92 \pm 0,99$ %; POI: $21,98 \pm 3,89$ %; $p=0,034$, en ambos casos). Este incremento en las anomalías morfológicas fue dosis-dependiente, siendo más moderado en el modelo DOR que en el POI (pre-antrales: $p=0,034$; antrales: $p=0,049$) (Figura 30C-D).

4.2. Análisis de los ovocitos MII y de los embriones

En ambos modelos de daño ovárico detectamos una reducción significativa respecto al grupo control en el número total de ovocitos MII (Figura 30E; DOR: $p=0,032$; POI: $p=0,049$, así como en el número total de embriones obtenidos tras la estimulación ovárica (Figura 30F; DOR: $p=0,032$; POI: $p=0,046$). Por otro lado, cuando comparamos ambos modelos entre sí, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en el número total de ovocitos MII (Figura 30E). No obstante, el número de MII viables (DOR: $6,3 \pm 2,0$; POI: $1,7 \pm 0,6$; $p=0,045$), la tasa de fecundación (DOR: $66,7 \pm 47,1$;

POI: $11,1 \pm 15,7$; $p=0,046$) y el número de embriones de 2-células (DOR: $3,3 \pm 1,0$; POI: $0,7 \pm 0,9$; $p=0,034$) fue menor en el modelo POI que en el modelo DOR.

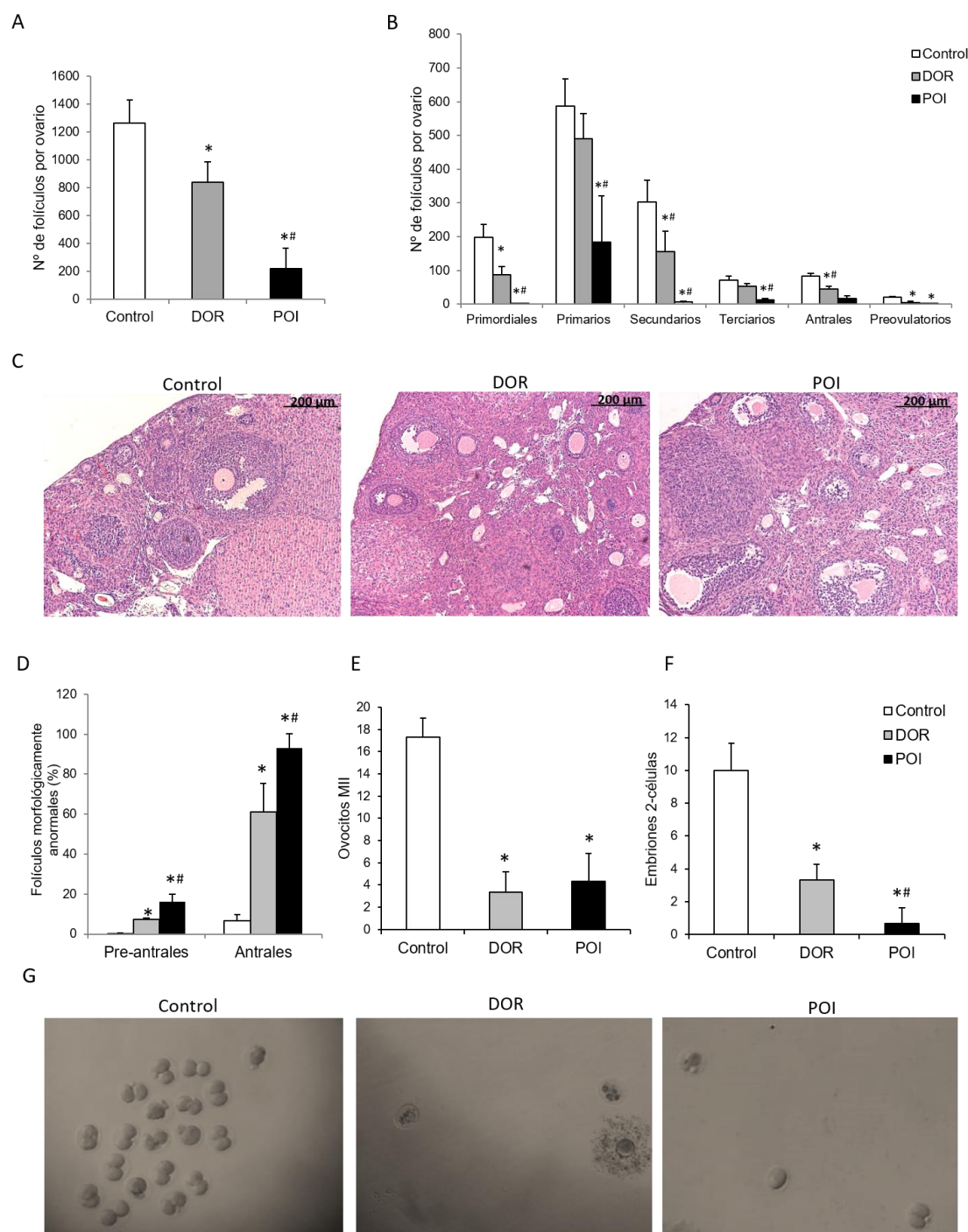


Figura 30. Potencial reproductivo a corto plazo. A) Número total de folículos en cada grupo ($n=4$ /grupo). B) Número de folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios, antrales y preovulatorios en los distintos grupos experimentales ($n=4$ /grupo). C) Imágenes representativas de la presencia de folículos morfológicamente anormales en los distintos grupos experimentales. Barra de escala=200µm. D) Porcentaje de folículos pre-antrales y antrales morfológicamente anormales ($n=4$ /grupo). E) Número de ovocitos MII recuperados del oviducto tras la estimulación ovárica. F) Número de embriones de 2-células obtenidos tras la estimulación ovárica y cruce con machos fértiles. G) Imágenes representativas de los MII y embriones obtenidos. * $p<0,05$ vs. grupo control. ** $p<0,05$ vs. grupo DOR. Adaptada de Buigues *et al.*, 2019 [212].

5. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo

A continuación, nos propusimos evaluar el potencial reproductivo de las hembras de ambos modelos mediante cruces sucesivos durante 12 semanas. Como se puede observar en la Tabla 5, en el modelo POI ninguna de las hembras fue capaz de quedar gestante a pesar de los sucesivos intentos de cruce. Por el contrario, las hembras DOR fueron capaces de conseguir gestaciones consecutivas y de parir crías sanas. No obstante, el tamaño de sus camadas fue significativamente menor que el de las hembras control (Tabla 5). Finalmente, analizamos si la administración de quimioterapia tenía algún efecto sobre el peso de las crías y/o sobre la distribución de sexo en las camadas, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Control: $1,6 \pm 0,1$ g; DOR: $1,5 \pm 0,1$ g; POI: --; $p=N.S.$, no estadísticamente significativo).

Tabla 5. Potencial reproductivo durante 12 semanas.

Variable		Control n=3	DOR n=3	POI n=3
Tasa de gestación	1 ^r cruce	100%	33%	0%
	2 ^o cruce	100%	66%	0%
	3 ^r cruce	100%	33%	0%
	Total	100±0	44±15%	0±0% ^{*#}
Tamaño de camada (n)	1 ^r cruce	10±1	7±0	0±0
	2 ^o cruce	9±1	6±1	0±0
	3 ^r cruce	10±1	5±0	0±0
	Total	10±1	6±0 [*]	0±0 ^{*#}

Se muestran los valores de la tasa de gestación y el tamaño de camada como media±desviación estándar.

* $p<0,05$ vs. grupo control. # $p<0,05$ vs. grupo DOR. Adaptada de Buigues et al., 2019 [212].

6. Alteraciones en el estroma ovárico y la apoptosis

Debido a la importancia del estroma ovárico en la activación y el mantenimiento del crecimiento folicular, evaluamos su estado en ambos modelos de daño ovárico. Como se puede observar en la Figura 31, al analizar las secciones ováricas de las hembras DOR y POI, observamos una degeneración estructural en la región central del estroma. Concretamente, en comparación con el grupo control, detectamos un incremento en el área degenerada de 2,5 veces en el modelo DOR y de 3,3 veces en el POI ($p=0,049$ y

$p=0,034$, respectivamente). A pesar de las diferencias entre modelos, estas no fueron estadísticamente significativas (DOR: $11,71 \pm 4,18\%$; POI: $15,62 \pm 5,39\%$; $p=N.S$). Las principales alteraciones observadas en el modelo de DOR fueron fibrosis y presencia de zonas acelulares desestructuradas de gran tamaño en el estroma. Por el contrario, los ovarios de las hembras POI se caracterizaron, principalmente, por presentar una gran cantidad de zonas acelulares de pequeño tamaño (Figura 31).

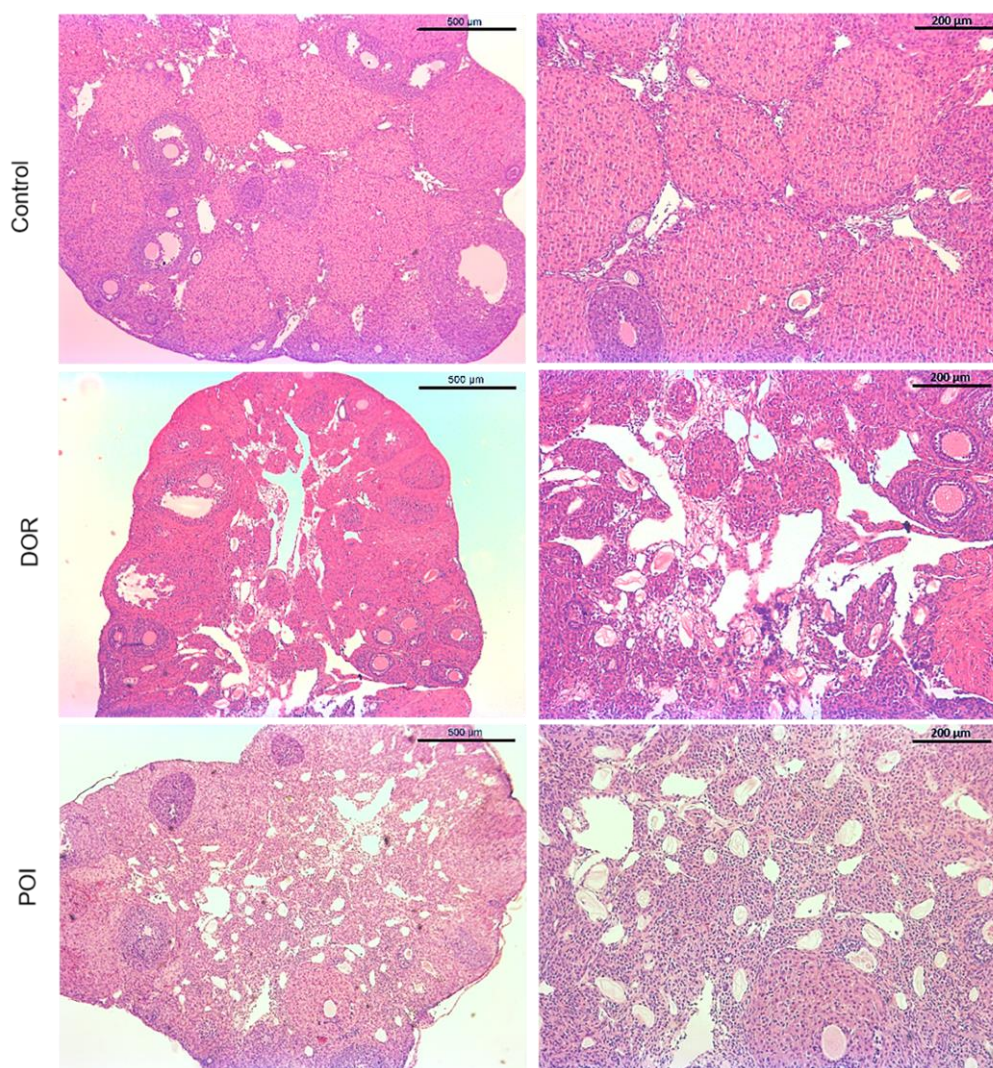


Figura 31. Estructura del estroma ovárico en los modelos de daño ovárico. Tinción H&E de las secciones ováricas mostrando la degeneración estromal y fibrosis observada en ambos modelos de daño ovárico (DOR y POI). El panel de la derecha recoge imágenes a un aumento 5x (barra de escala=500µm), mientras que el panel de la izquierda recoge imágenes a 10x (barra de escala=200µm). Adaptada de Buigues *et al.*, 2019 [212].

Además de evaluar la estructura histológica del ovario, analizamos la vascularización del estroma en los distintos grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 32A,

detectamos una reducción en la MVD en los ovarios de ambos modelos, siendo este descenso en la vascularización dosis-dependiente (Control: $4,7 \pm 1,0$ %; DOR: $2,7 \pm 0,9$ %; POI: $1,8 \pm 0,7$ %; $p=0,049$ y $p=0,025$ vs. grupo control, respectivamente).

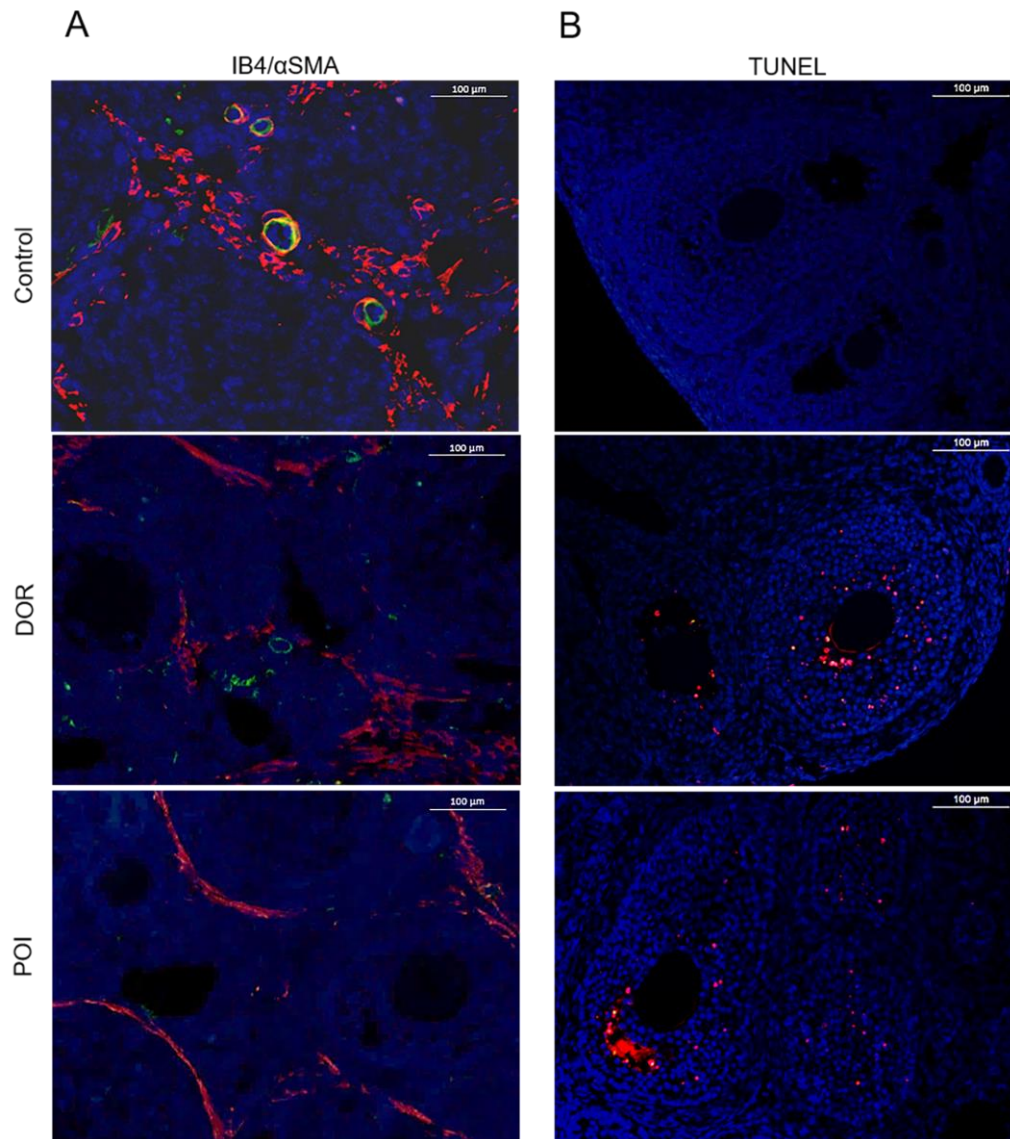


Figura 32. Análisis de la vascularización del estroma y de la apoptosis en los modelos de daño ovárico. A) Vascularización ovárica. Se muestra la IB4 (marcador de células endoteliales) en verde, el α -SMA (marcador de células de músculo liso) en rojo y los núcleos (teñidos con DAPI) en azul. La señal verde representa nuevos vasos, la señal verde rodeada por una señal roja representa vasos maduros y la señal roja aislada corresponde a las células estromales que rodean a los folículos (células musculares). La vascularización del estroma ovárico se redujo significativamente en los modelos de DOR y POI ($n=4$ /grupo). B) Ensayo TUNEL mostrando las células apoptóticas en rojo y los núcleos celulares en azul (DAPI). La apoptosis fue mayor en los modelos de DOR y POI que en el grupo control ($n=4$ /grupo). Barra de escala=100μm. Adaptada de Buigues *et al.*, 2019 [212].

Finalmente, evaluamos la apoptosis mediante ensayo TUNEL. En el grupo control se detectaron pocas células apoptóticas (Figura 32B). No ocurrió lo mismo en las

secciones ováricas del grupo DOR y POI, en los que se observó un incremento en el porcentaje de apoptosis de 40 veces respecto al grupo control (Control: $0,01 \pm 0,01$; DOR: $0,52 \pm 0,33$; POI: $0,52 \pm 0,33$; $p=0,025$ en ambos casos). Aunque se observó apoptosis en el estroma, la mayoría de las células apoptóticas detectadas fueron CG de folículos antrales, observándose en los ovarios de las hembras DOR y POI (a diferencia de en los ovarios control) numerosos folículos con más de un 20% de CG apoptóticas. En cuanto a la apoptosis a nivel folicular cabe también destacar que en ninguno de los grupos de estudio observamos tinción TUNEL-positiva en las células de la pre-granulosa ni en los ovocitos de folículos primordiales.

B) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN MODELOS ANIMALES DE DOR-PR Y POI

1. Caracterización de las poblaciones de BMDSC

Analizamos las poblaciones celulares presentes en las muestras de aféresis obtenidas de las pacientes PR empleando distintos marcadores del linaje hematopoyético (BMDSC: CD34+, CD133+; Células diferenciadas: CD45+). La movilización con G-CSF incrementó en casi 24 veces la presencia de BMDSC en sangre periférica, detectándose en todos los casos más de 10,000 células CD34+/mL. Respecto al total de células de la aféresis, la población de células madre hematopoyéticas CD34+ representó un $0.8 \pm 0.2\%$ y la de CD133+ un $0.6 \pm 0.2\%$. Al estudiar la coexpresión de marcadores, observamos que la mayoría de las células CD133+ viables también expresaban el marcador CD34+, representando las células CD133+CD34- (las más indiferenciadas dentro de la médula ósea) solo un $2,1 \pm 1,4\%$ del total de CD133+ viables. Por otro lado, el $98,2 \pm 1,5\%$ de las células CD133+ viables mostró una expresión baja del marcador leucocitario común CD45 (CD45+), indicando su no diferenciación en leucocitos. De hecho, solo un $1,7 \pm 1,2\%$ de las CD133+ viables pudo ser clasificado como leucocitos en base a su fuerte expresión del antígeno CD45 (CD45++).

2. Viabilidad y eficiencia del marcaje con MIRB

Antes de la infusión, evaluamos mediante citometría de flujo la viabilidad celular y la eficiencia del marcaje con MIRB de las poblaciones BMDSC y PBMNC. La viabilidad celular fue de $95,5 \pm 3,5\%$ y de $96,1 \pm 1,4\%$, respectivamente. Por otro lado, la eficiencia

del marcaje con MIRB fue de $80,3 \pm 4,5$ en el caso de la población de BMDSC y de $79,2 \pm 3,5$ en el de la población de PBMNC.

3. Monitorización del ciclo estral

Con el fin de establecer los posibles efectos regenerativos de las BMDSC sobre la función ovárica, en primer lugar, monitorizamos el ciclo estral a lo largo del experimento (Figura 33).

En ambos modelos de daño ovárico, el 75% de los animales recuperaron la ciclicidad tras la infusión de BMDSC. Estos animales, a diferencia de los controles, volvieron a presentar las fases de proestro y estro, previsiblemente como consecuencia de la restauración en la secreción de estradiol. Por el contrario, la infusión de PBMNC no fue capaz de restablecer la regularidad estral ni en el modelo DOR ni en el POI. Así, como se puede observar en la Figura 33, todos los ratones tratados con PBMNC (a excepción de uno del grupo DOR-PBMNC) permanecieron en las fases no receptivas de metaestro y diestro, al igual que los ratones de los grupos control (DOR-Control; POI-Control). Los efectos de las BMDSC sobre la recuperación del ciclo estral se vieron reflejados al analizar el número de ciclos completados a lo largo de los 21 días de monitorización. A diferencia de las PBMNC, las BMDSC incrementaron significativamente el número de ciclos completados tanto en el modelo DOR (Control: $0,8 \pm 0,4$ ciclos; PBMNC: $0,8 \pm 0,4$ ciclos; BMDSC: $2,3 \pm 0,9$ ciclos; $p=0,036$) como en el modelo POI (Control: $0,5 \pm 0,5$ ciclos; PBMNC: $0,6 \pm 0,5$ ciclos; BMDSC: $1,5 \pm 1,3$ ciclos; $p=N.S$).

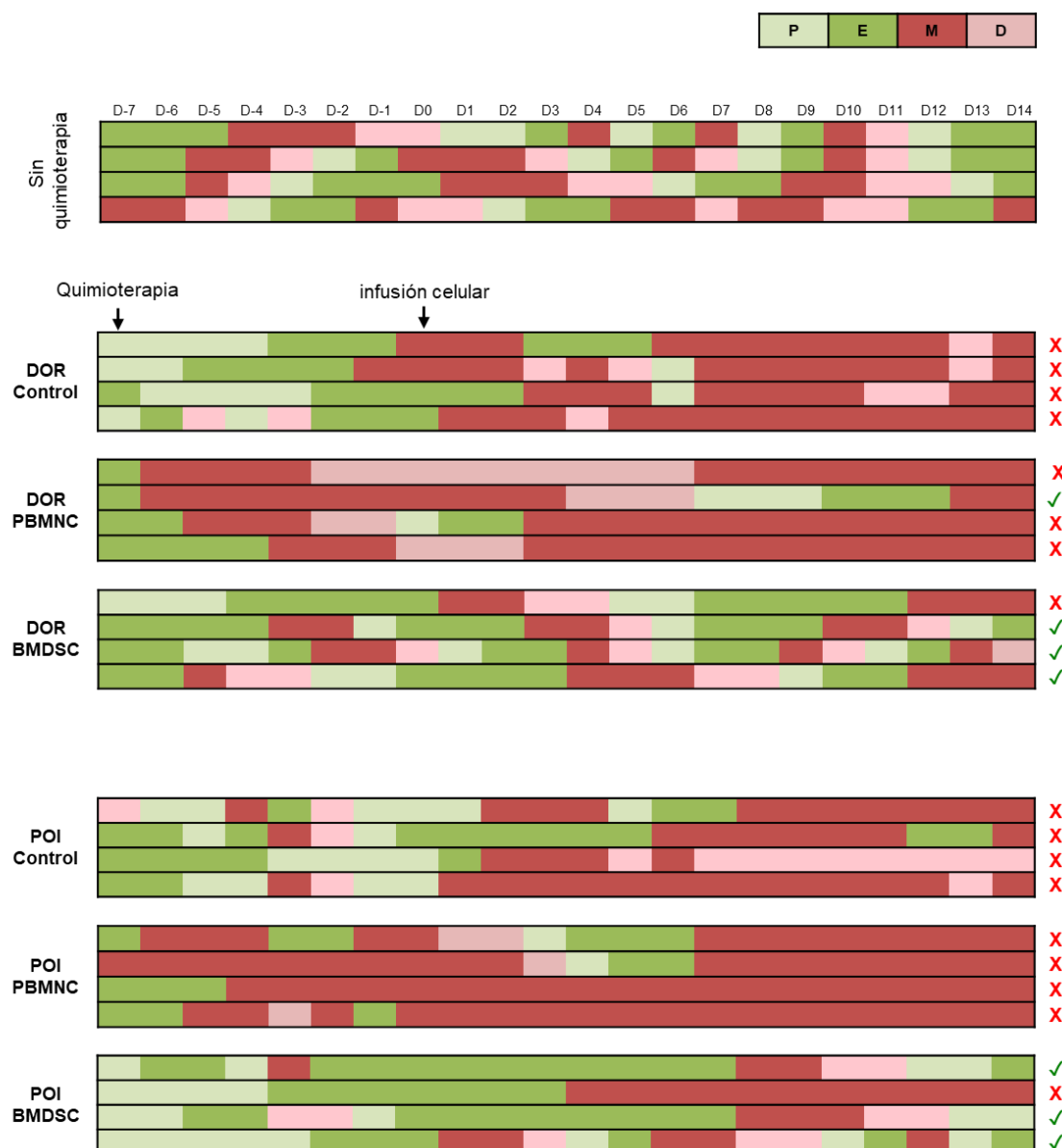


Figura 33. Efectos de la infusión de BMDSC sobre el ciclo estral en los modelos de DOR y POI. El panel superior muestra el ciclo estral de un ratón no tratado con quimioterapia (ciclicidad regular). Las BMDSC fueron capaces de restablecer la ciclicidad estral alterada por la administración de quimioterapia en ambos modelos de daño ovárico. De hecho, los animales tratados con BMDSC presentaron de nuevo fases de proestro (P, verde claro) y estro (E, verde oscuro), sugiriendo esto un restablecimiento de la secreción de estradiol. Por el contrario, los ratones de los grupos control, así como los ratones tratados con PBMNC, permanecieron en las fases no receptivas de metaestro (M, rojo claro) y diestro (D, rojo oscuro). La marca de verificación verde indica recuperación de la ciclicidad estral, mientras que las cruces rojas indican alteración y/o interrupción del ciclo estral. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

4. Evaluación del peso, tamaño y estructura ovárica tras la estimulación

Al final del experimento, se comparó el peso corporal de los animales de los distintos grupos experimentales, no detectándose diferencias estadísticamente significativas ni en el modelo DOR (Control: $20,55 \pm 0,76$; PBMNC: $21,10 \pm 1,82$; BMDSC: $20,30 \pm 1,09$; $p=N.S$) ni en el modelo POI (Control: $20,15 \pm 1,24$; PBMNC: $20,50 \pm 2,23$; BMDSC:

20,50 \pm 0,57; $p=N.S$). No obstante, observamos que el peso ovárico de los animales tratados con BMDSC era mayor que el de los ratones control. Esto fue así tanto en el modelo DOR (Control: 18,8 \pm 2,0; BMDSC: 25,2 \pm 2,2 mg), como en el modelo POI (Control: 9,0 \pm 3,3; BMDSC: 16,9 \pm 2,9 mg; $p=0,043$). La misma tendencia se observó al normalizar el peso ovárico respecto al peso corporal (Figura 8A). Por el contrario, la infusión de PBMNC no tuvo ningún efecto sobre el peso ovárico, no detectándose diferencias respecto al grupo control ni en dicho parámetro (DOR-Control: 18,8 \pm 2,0; DOR-PBMNC: 12,9 \pm 2,3 mg; $p=N.S$ and POI-Control: 9,0 \pm 3,3; POI-PBMNC: 11,0 \pm 2,0 mg; $p=N.S$) ni en la ratio peso ovárico/peso corporal (Figura 34A).

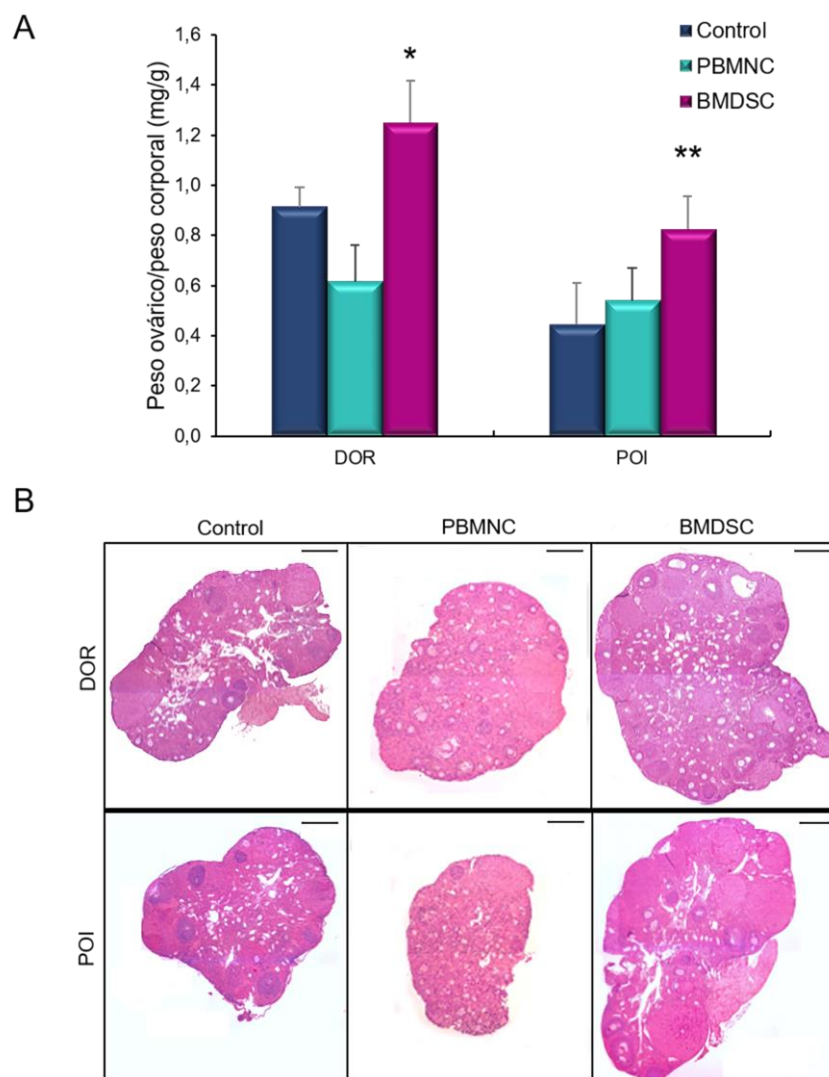


Figura 34. Incremento del peso y tamaño ovárico tras la infusión de BMDSC. A) Peso ovárico tras la estimulación ovárica normalizado respecto al peso corporal de los animales. B) Secciones ováricas de los diferentes grupos experimentales teñidas con hematoxilina-eosina (Barra de escala= 500 μ m). Las BMDSC incrementaron el peso y tamaño ovárico tanto en el modelo DOR como en el modelo POI. Por el contrario, las PBMNC no tuvieron efecto alguno sobre estos parámetros. * $p<0,05$ vs. DOR-control. ** $p<0,05$ vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

Por otro lado, al analizar histológicamente los ovarios, observamos a simple vista que las secciones ováricas de los animales tratados con BMDSC eran de mayor tamaño que las secciones ováricas de los animales de los grupos control y PBMNC. Aunque este incremento de tamaño se observó en ambos modelos de daño ovárico, fue macroscópicamente más evidente en el modelo POI, tal y como se puede observar en la Figura 34B. Además, en la evaluación histológica detectamos en los ovarios de los grupos control y PBMNC una gran cantidad de CG apoptóticas con cuerpos picnóticos, especialmente en el modelo POI. Por su parte, las secciones ováricas del grupo BMDSC se caracterizaron, principalmente, por la presencia de folículos morfológicamente normales, así como de estructuras sinusoides, previsiblemente vasos sanguíneos.

5. Migración e injerto de las células injectadas

Con el objetivo de evaluar si las células injectadas eran capaces de migrar y anidarse en el tejido ovárico murino dañado por la quimioterapia, realizamos una tinción para detectar células marcadas con MIRB. En los ovarios de todos los animales tratados con BMDSC detectamos células MIRB-positivas. Concretamente, en el modelo DOR estas células representaban de media un $0,7 \pm 0,2$ % de la celularidad total del ovario, mientras que en el modelo POI suponían un $1,1 \pm 0,4$ %. Entre las numerosas células MIRB-positivas que se observaron en el estroma ovárico, la mayoría se localizaban cerca de vasos sanguíneos y en algunos casos en los folículos, específicamente entre las células de la teca. Por el contrario, en los ovarios de los animales tratados con PBMNC solo se detectaron un total de tres células marcadas con MIRB (DOR- PBMNC: $0,0 \pm 0,0\%$; POI-PBMNC: $0,0 \pm 0,0\%$). Concretamente, estas tres células se detectaron en un mismo ovario, localizándose una de ellas dentro de un vaso sanguíneo como célula circulante y las dos restantes en el estroma ovárico. En los ovarios de los grupos control no detectamos ninguna célula MIRB-positiva (Figura 35).

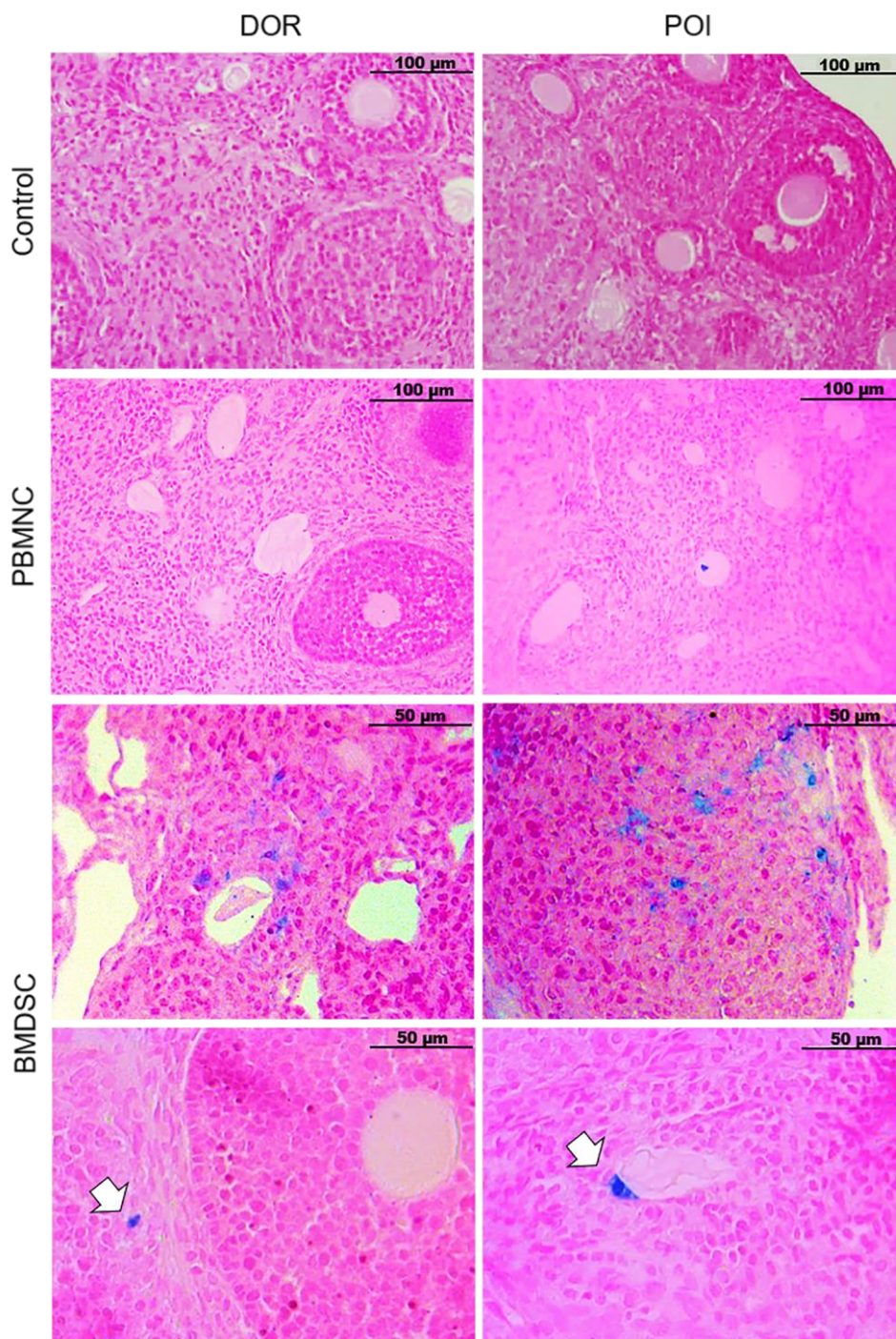


Figura 35. Presencia de las células inyectadas en el tejido ovárico. Tinción *Prussian Blue* de las células marcadas con Ion Molday-Rodamina B (MIRB). Las células MIRB positivas aparecen teñidas de azul. No se detectaron células MIRB-positivas en las secciones ováricas de los grupos control (panel superior; barra de escala=100µm). En los ovarios de los ratones tratados con PBMNC solo se detectaron un total de 3 células, una de ellas como célula circulante dentro de un vaso sanguíneo (segundo panel, derecha; barra de escala=100µm). Por el contrario, en los animales tratados con BMDSC detectamos numerosas células marcadas (tercer panel; barra de escala=50µm). En el panel inferior se muestran imágenes del grupo BMDSC (barra de escala= 50 µm) donde se puede observar la localización de estas células dentro de la capa de la teca de un folículo antral (izquierda) y cerca de vasos sanguíneos pequeños (derecha). Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

6. Evaluación del potencial reproductivo a corto plazo

6.1. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular

Al analizar el número total de folículos, no detectamos diferencias entre los distintos grupos ni en el modelo DOR (Control: 704 ± 206 folículos; PBMNC: 378 ± 85 folículos; BMDSC: 759 ± 463 folículos; $p = \text{N.S}$) ni en el modelo POI (Control: 230 ± 140 folículos; PBMNC: 254 ± 21 folículos; BMDSC: 295 ± 83 folículos; $p = \text{N.S}$). Del mismo modo, no detectamos ninguna diferencia entre grupos experimentales en cuanto al porcentaje de folículos primordiales y preantrales (primarios, secundarios y terciarios).

No obstante, en los ratones tratados con BMDSC detectamos un incremento en el porcentaje de folículos antrales (Figura 36A) y preovulatorios (Figura 36B) tras la EOC en comparación con el grupo control. Concretamente, en el modelo de DOR, ambas poblaciones aumentaron tras la infusión de BMDSC, a pesar de que solo fue estadísticamente significativo el aumento de los folículos preovulatorios ($p = 0,04$ vs. su grupo control). Además, observamos un mayor porcentaje de cuerpos lúteos tras la inyección de BMDSC, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 36C). En el modelo POI, ambas poblaciones se incrementaron significativamente tras la inyección de BMDSC ($p = 0,01$ y $p = 0,004$ vs. su grupo control, respectivamente).

A diferencia del tratamiento con BMDSC, la infusión de PBMNC no favoreció el crecimiento folicular, no detectándose diferencias en el porcentaje de folículos antrales, preovulatorios y cuerpos lúteos entre los grupos PBMNC y sus respectivos grupos control (Figura 36A-C).

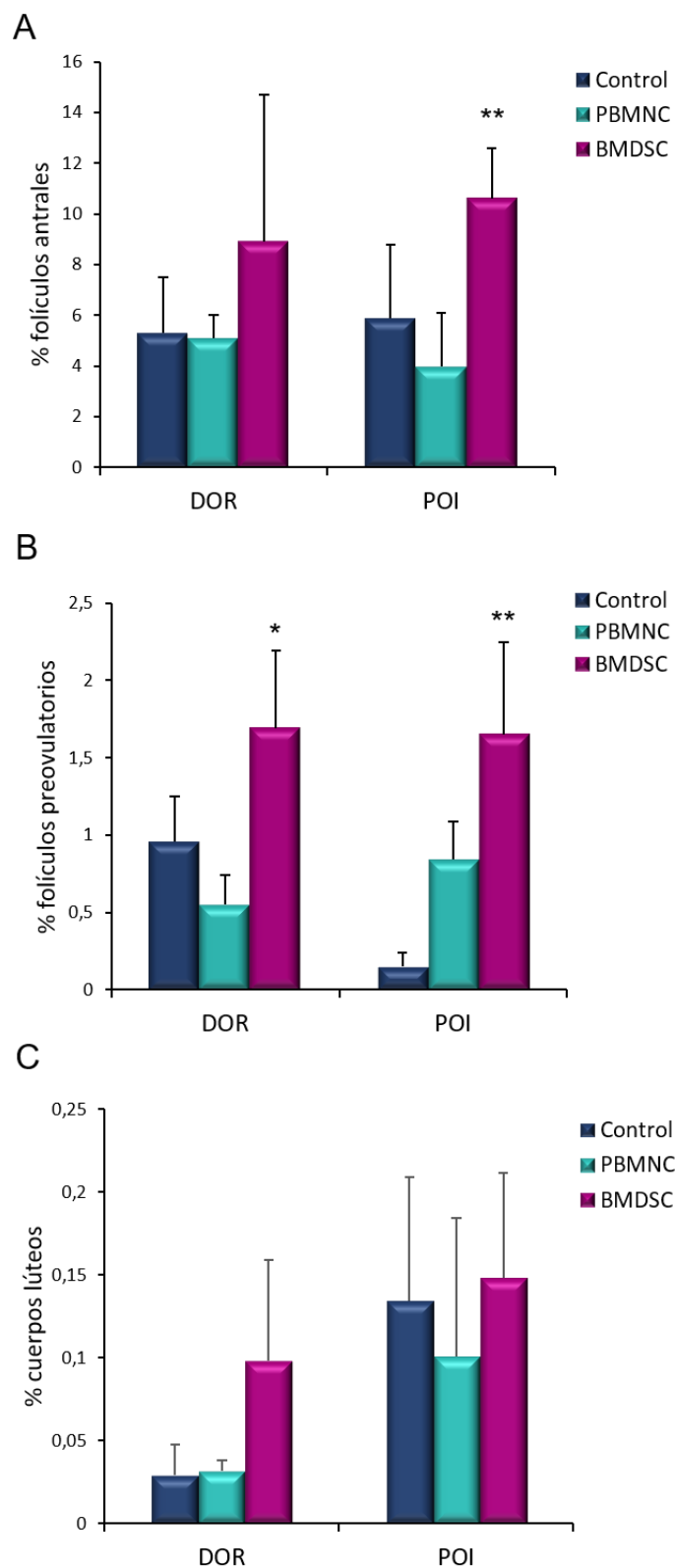


Figura 36. Rescate folicular tras la infusión de BMDSC. Porcentaje de folículos antrales (A), preovulatorios (B) y cuerpos lúteos (C) en los distintos grupos experimentales tras la estimulación ovárica. Las BMDSC incrementaron el porcentaje de folículos grandes (antrales y preovulatorios) así como el de cuerpos lúteos. Por el contrario, las PBMNC no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento folicular y formación de cuerpos lúteos. * $p < 0.05$ vs. DOR-control. ** $p < 0,05$ vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

6.2. Análisis de los ovocitos MII y de los embriones

En el modelo DOR, la infusión de BMDSC provocó un incremento de tres veces respecto al grupo control en el número total de ovocitos MII recuperados del oviducto tras la estimulación ($p=0,04$), tal y como se puede observar en la Figura 37A. No se detectaron, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas en el número total de embriones obtenidos ni en su viabilidad (Figura 37B, Tabla 6). En el modelo POI, si bien no se detectaron diferencias en el número de ovocitos MII tras la infusión de BMDSC (Figura 37A), la tasa de fecundación y el número de embriones obtenidos se incrementó significativamente en comparación con el grupo control ($p=0,049$ y $p=0,049$, respectivamente) (Figura 37B, Tabla 6). Por el contrario, la administración de PBMNC no tuvo ningún efecto sobre el número de ovocitos MII, el número de embriones y la tasa de fecundación en ninguno de los modelos de daño ovárico. Así, como se puede observar en la Figura 37A-B y en la Tabla 6, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en dichos parámetros entre los grupos tratados con PBMNC y sus respectivos grupos control.

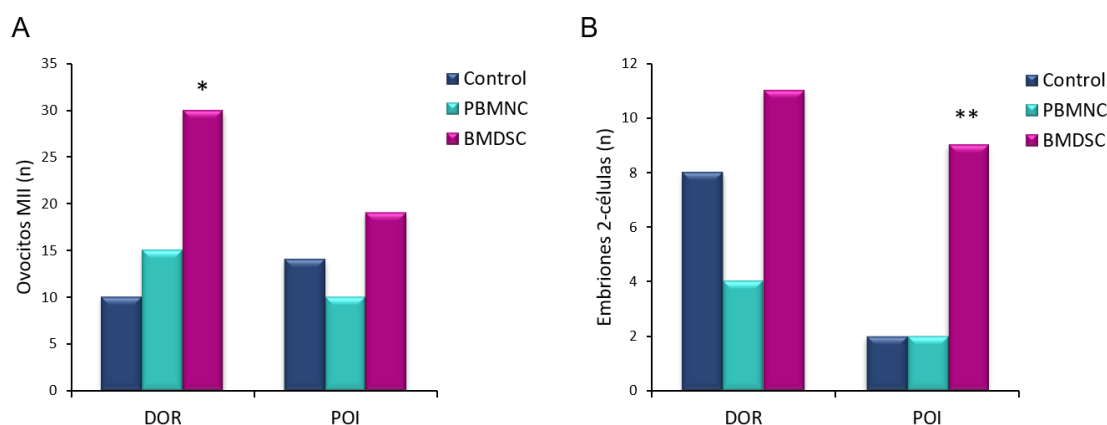


Figura 37. La infusión de BMDSC incrementó el número total de ovocitos MII y de embriones obtenidos tras la estimulación ovárica. A) El número total de ovocitos MII recuperados del oviducto 16 horas después de la administración de hCG fue mayor en los ratones que recibieron células madre (BMDSC) que en los ratones de los grupos control y PBMNC, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el modelo DOR. B) La cantidad total de embriones de 2-células obtenidos también fue mayor tras la inyección de células madre (grupos BMDSC), siendo el incremento estadísticamente significativo en el modelo POI. * $p<0,05$ vs. DOR-control. ** $p<0,05$ vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

Tabla 6. Efectos de la infusión de BMDSC sobre el número de ovocitos y embriones obtenidos tras la estimulación ovárica.

Grupo experimental	Ovocitos MII (n)	Embriones 2-células (n)	Tasa de fecundación (%)
DOR-Control	2,5±2,5	2,8±2,9	50±57,7%
DOR-PBMNC	5,3±3,1	1±1	25±25%
DOR-BMDSC	7,3±6,9 ^A	2,8±3,8	30,3±27,4%
POI-Control	4,3±3,4	0,7±1,2	11,1±19,2%
POI-PBMNC	6±3,4	1,8±0,5	37,3±19,4%
POI-BMDSC	4,5±1,7	2,3±1,0	56,7±8,2% ^B

Se muestran los resultados como media \pm desviación estándar de los ovocitos MII y embriones recuperados del oviducto tras la estimulación ovárica y cruce con machos fértiles, así como la tasa de fecundación (Embriones/MII). ^A $p=0,040$ vs. DOR-Control, ^B $p=0,049$ vs. POI-Control. N=3-4/grupo.

7. Evaluación del potencial reproductivo a largo plazo

Evaluamos también si la infusión celular tenía algún efecto sobre el potencial reproductivo a largo plazo de los animales de ambos modelos de daño ovárico. En el modelo DOR, las hembras de los tres grupos fueron capaces de quedar gestantes y de dar a luz a crías sanas al menos una vez durante las 12 semanas de cruces sucesivos (Figura 38A). No obstante, la infusión de BMDSC incrementó el tamaño de las camadas, siendo éste significativamente superior que el de las hembras control y las tratadas con PBMNC (DOR-Control: $6,3 \pm 0,9$ crías; DOR-PBMNC: $5,0 \pm 0,0$ crías; BMDSC: $10,3 \pm 1,9$ crías; $p=0,038$). En lo que respecta al modelo POI, ninguno de los animales control ni tratados con PBMNC quedó gestante de forma espontánea a pesar de los sucesivos cruces que se llevaron a cabo. Por el contrario, los animales tratados con BMDSC fueron capaces de alcanzar hasta tres gestaciones consecutivas (Figura 38A), siendo el tamaño medio de camada de $8,0 \pm 0,8$ crías sanas.

Además, en ambos modelos el número acumulado de crías obtenidas a lo largo de las 12 semanas fue mayor en el grupo BMDSC que en los grupos control y PBMNC (DOR-Control: 19 crías; DOR-PBMNC: 5 crías; DOR: BMDSC: 31 crías; POI-Control: 0

crías; POI-PBMNC: 0 crías; POI-BMDSC: 24 crías). Todas las crías obtenidas de hembras tratadas con células madre fueron sanas, sin malformaciones y normales en términos de peso y tamaño (Figura 38B).

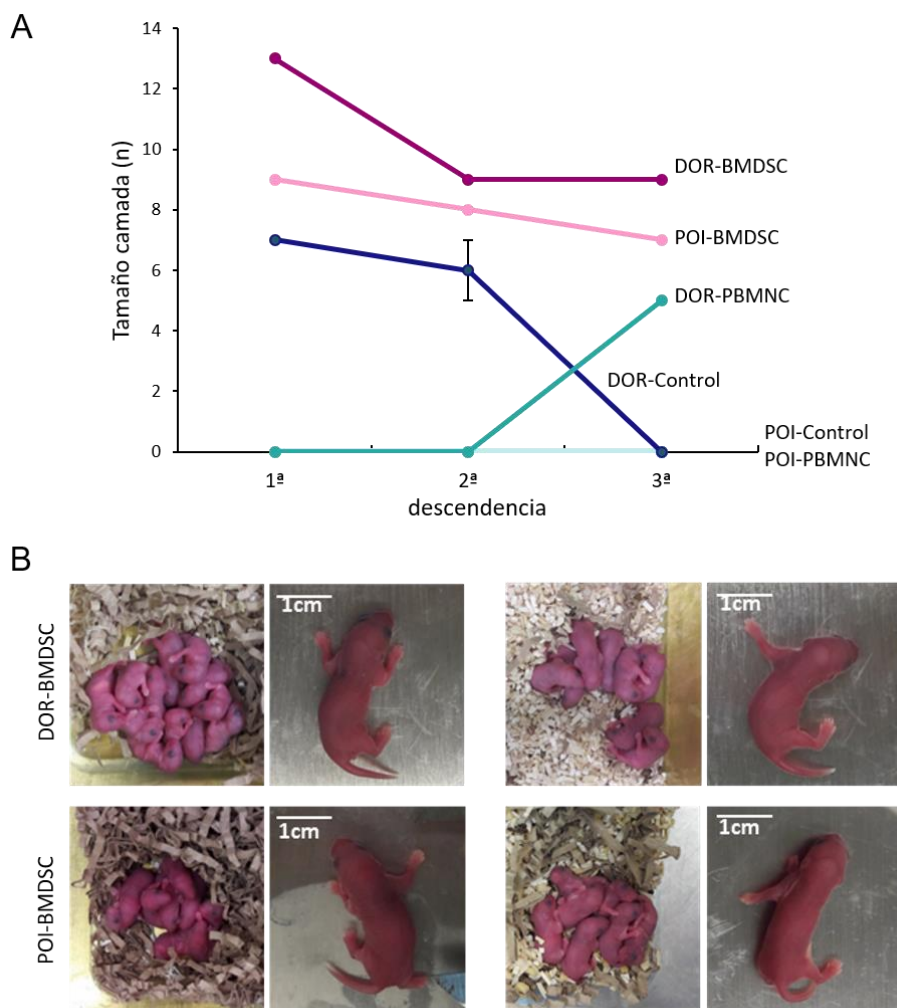


Figura 38. Incremento del potencial reproductivo a largo plazo tras la infusión de BMDSC. A) Tamaño de camada en los distintos grupos experimentales. En el modelo DOR la administración de BMDSC incrementó el número de crías sanas obtenidas en las sucesivas gestaciones espontáneas. Por su parte, en el modelo POI, la infusión de BMDSC supuso la recuperación de la fertilidad tras el daño ovárico severo inducido por la quimioterapia. B) Se muestran las camadas obtenidas tras la infusión de BMDSC tanto en el modelo DOR (panel superior) como en el modelo POI (panel inferior). No se detectaron diferencias en el tamaño de las crías entre las distintas camadas. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

8. Análisis de la vascularización del estroma ovárico murino

Cuando evaluamos el grado de vascularización del estroma ovárico en los distintos grupos experimentales, observamos que la administración de BMDSC incrementaba la MVD. Concretamente, en el modelo de POI se detectó un incremento de 2,8 veces en este parámetro respecto a los grupos control y PBMNC ($p=0,012$ y $p=0,049$,

respectivamente). Menor fue el incremento detectado tras la administración de BMDSC en el modelo de DOR, en donde las diferencias respecto a los grupos control y PBMNC no fueron estadísticamente significativas (Figura 39A-B).

En concordancia con este resultado histológico, cuando analizamos la vascularización mediante RT-qPCR, observamos que la expresión génica del marcador endotelial *Cd31* se incrementaba tras la administración de BMDSC con respecto al grupo control en el modelo POI (fc: $1,4 \pm 0,2$; $p=0,049$). En el modelo DOR, no obstante, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de este marcador endotelial entre los animales tratados con BMDSC y los controles (fc: $1,0 \pm 0,2$; $p=N.S$).

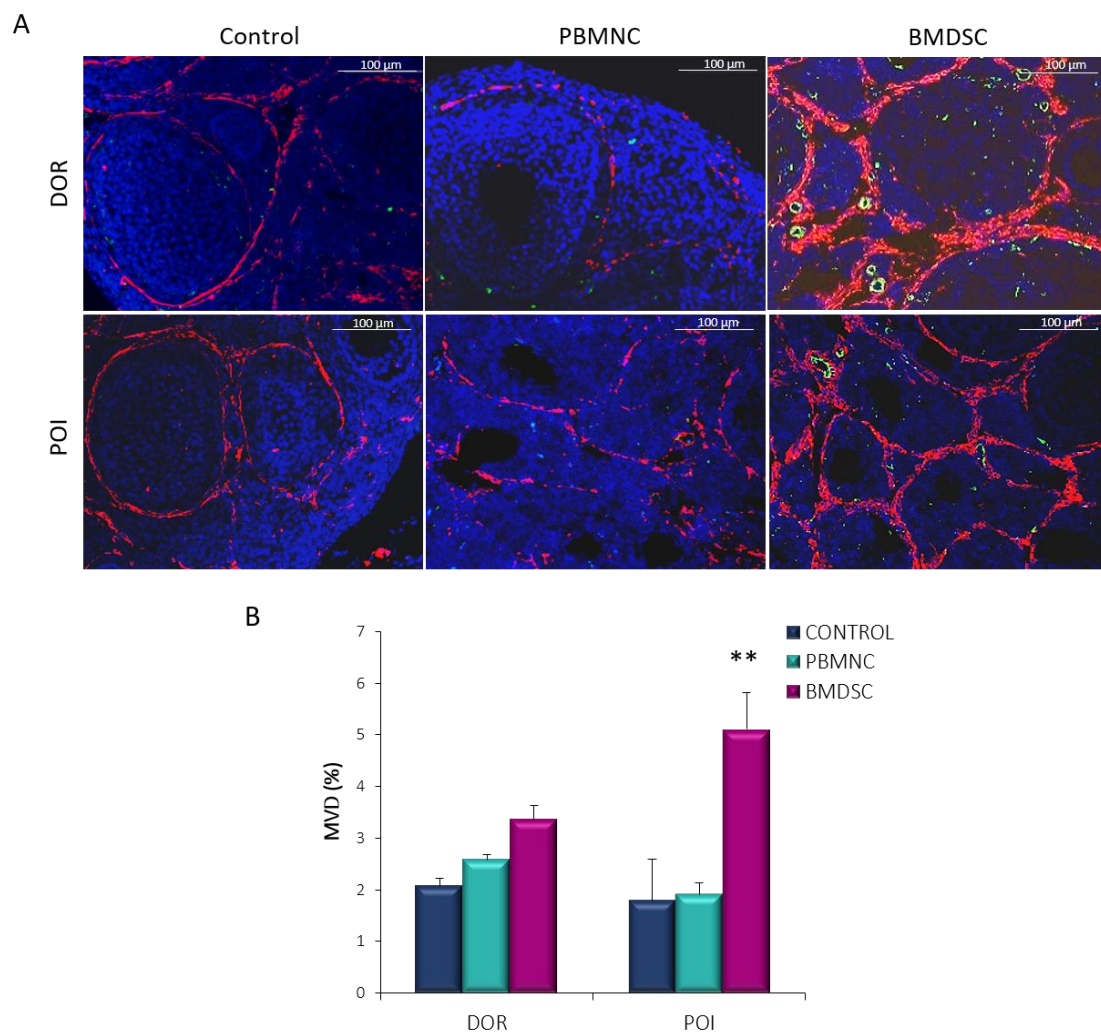


Figura 39. Mejora de la vascularización del estroma ovárico murino tras la infusión de BMDSC. A) Inmunofluorescencia combinada de IB4 (células endoteliales, verde) y α -sma (células músculo liso, rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Barras de escala=100 μ m. B) La densidad microvascular (MVD) se incrementó tras la administración de células madre, siendo este incremento significativo en el modelo de POI (n=4/grupo). La administración de PBMNC no tuvo ningún efecto sobre la vascularización del nicho ovárico. ** $p<0,05$ vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

9. Estudio de la proliferación y de la apoptosis

Al analizar mediante inmunohistoquímica la proliferación celular observamos células Ki67-positivas en el estroma ovárico de los distintos grupos experimentales (Figura 40A). Sin embargo, la infusión de BMDSC promovió la proliferación celular. Concretamente, en ambos modelos de daño ovárico el porcentaje de células proliferativas fue dos veces mayor en los grupos tratados con BMDSC que en sus respectivos grupos control grupo. Por el contrario, la infusión de PBMNC no afectó a la proliferación, no detectándose diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ni en el modelo DOR ni en el modelo POI (Figura 40A-B).

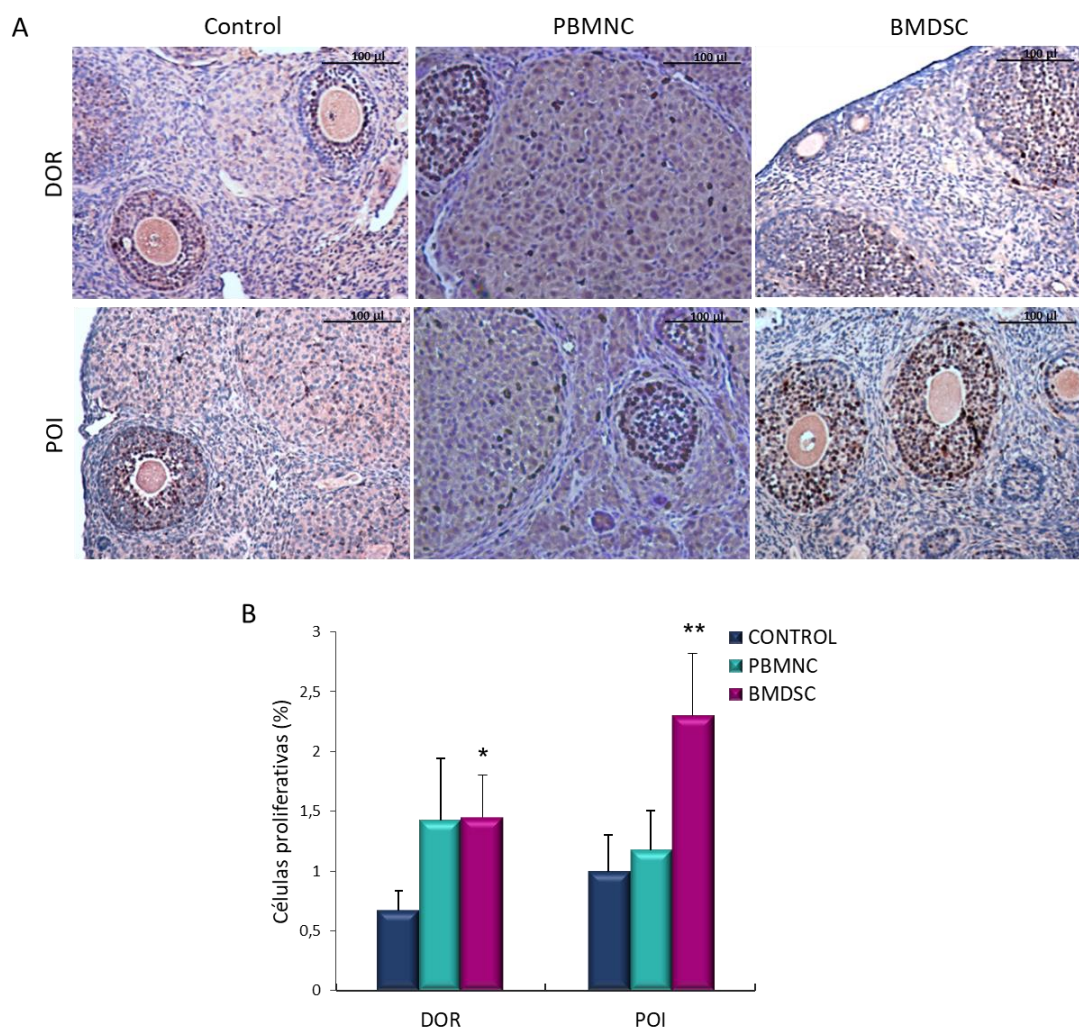


Figura 40. Incremento en la proliferación tras la administración de BMDSC. A) Secciones ováricas de los distintos grupos experimentales tras inmunohistoquímica frente al marcador de proliferación Ki67 (marrón). Se detectaron células proliferativas en los folículos y el estroma de todas las muestras. No obstante, el porcentaje de células proliferativas (B) se incrementó tras la administración de BMDSC tanto en el modelo DOR como en el modelo POI. N=4/grupo. Barra de escala=100µm. *p<0.05 vs. grupo DOR-control. **p<0,05 vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

Finalmente, analizamos la apoptosis mediante ensayo TUNEL (Figura 41A). En el modelo de DOR, la infusión de BMDSC provocó una reducción de 10 veces en la proporción de células apoptóticas en comparación con el grupo control ($p=0,03$). Del mismo modo, en el modelo de daño ovárico severo, la administración de dichas células madre redujo 11 veces la apoptosis ($p=0,03$ vs. grupo control). En ninguno de los modelos, el tratamiento con PBMNC fue capaz de aminorar la apoptosis (Figura 41B).

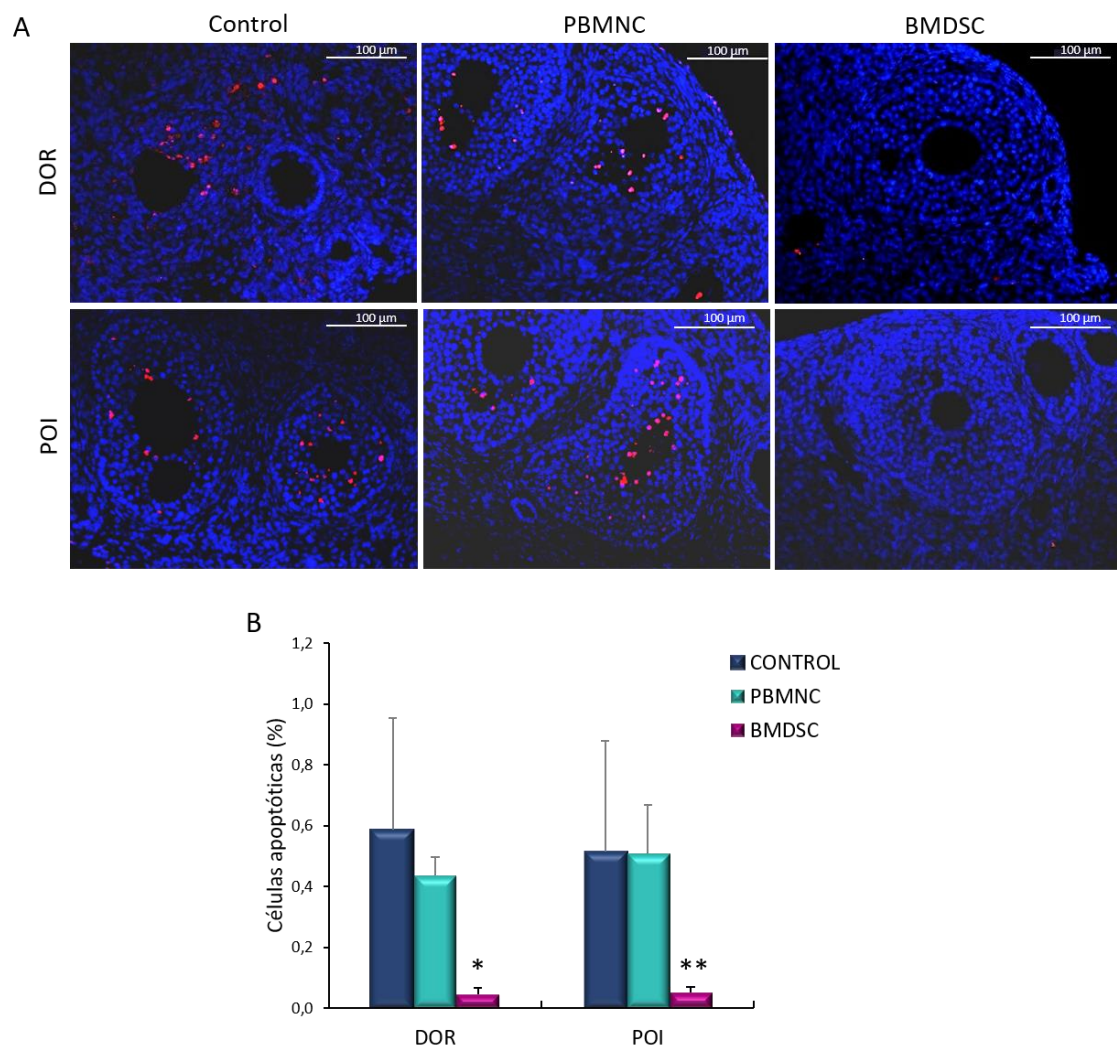


Figura 41. Reducción de la apoptosis tras la administración de BMDSC. A) Ensayo TUNEL mostrando las células apoptóticas (rojo) y los núcleos celulares (azul, DAPI). Barras de escala=100µm. B) La cuantificación de las células apoptóticas en el estroma ovárico mostró que la inyección de BMDSC reducía los niveles de apoptosis, siendo menor el porcentaje de células apoptóticas en los grupos DOR-BMDSC y POI-BMDSC en comparación con sus respectivos grupos control. La administración de PBMNC no redujo la apoptosis en el ovario. N=4/grupo. * $p<0.05$ vs. DOR-control. ** $p<0,05$ vs. POI-control. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

C) EFECTOS REGENERATIVOS DE LA INFUSIÓN DE BMDSC EN TEJIDO OVÁRICO HUMANO DE PACIENTES PR

1. Viabilidad y eficiencia del marcaje con MIRB

Antes de la infusión celular, evaluamos mediante citometría de flujo la viabilidad celular y la eficiencia del marcaje con MIRB, tanto en el caso de la población BMDSC como de la fracción CD133. Como se puede observar en la Figura 42A, la viabilidad celular fue similar, y superior al 95%, en ambas poblaciones celulares. Concretamente, fue de media $96,2 \pm 2,2$ % para la población total (BMDSC) y $96,2 \pm 2,5$ % para la fracción CD133. Por otro lado, se registró una eficiencia del marcaje con MIRB del $81,2 \pm 3,5$ % para la población de BMDSC. Un poco inferior fue de media la eficiencia del marcaje de la población CD133: $73,8 \pm 4,0$ % (Figura 42B).

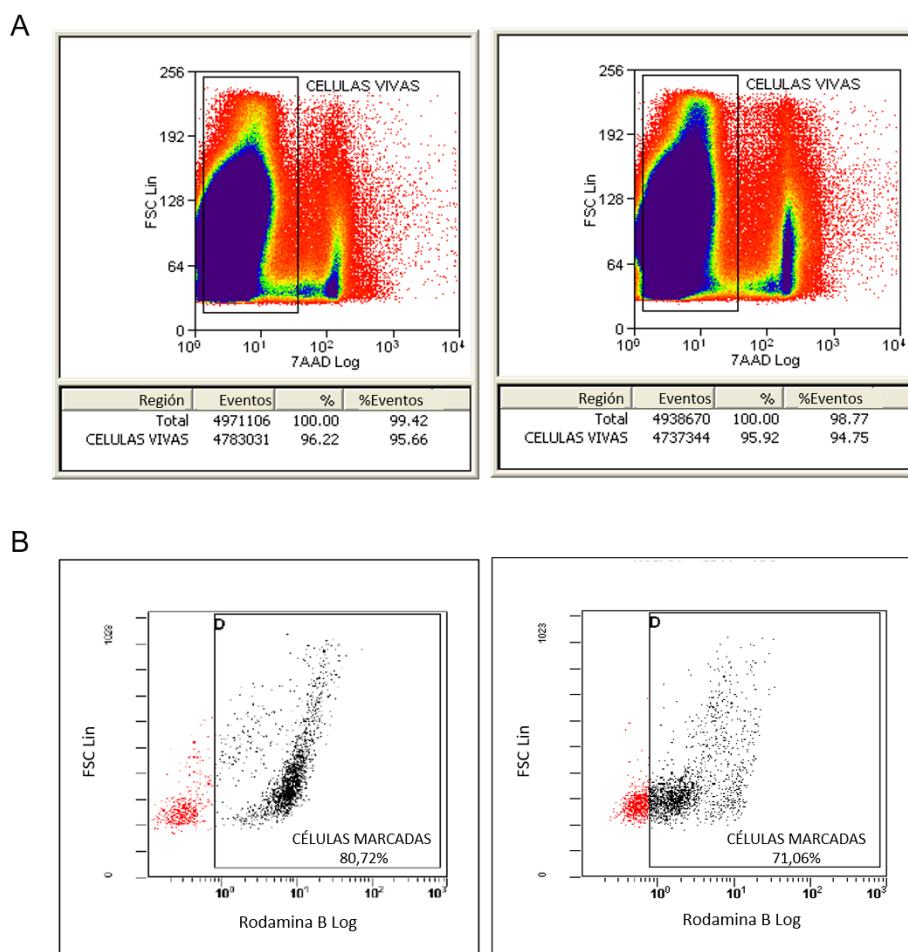
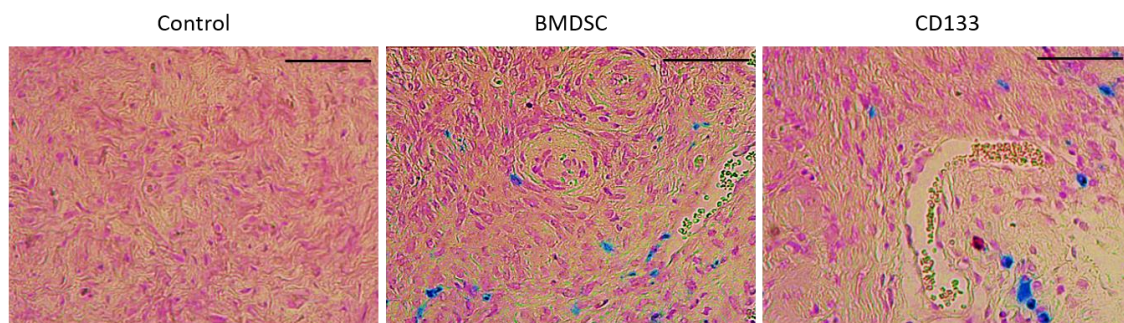


Figura 42. Viabilidad celular y eficiencia del marcaje. A) Diagrama de citometría de flujo representativo de la viabilidad celular en la población total de BMDSC. La viabilidad celular se determinó realizando un marcaje con 7-Aminoactinomicina (7-AAD), incorporado exclusivamente por las células muertas. B) Diagrama de citometría de flujo representativo de la eficiencia del marcaje en el caso de la población de BMDSC (izquierda) y de la fracción CD133 (derecha). El cuadro negro delimita los eventos rodamina-positivos, es decir, las células marcadas con Ion Molday-Rodamina B. FSC Lin= Señal de dispersión frontal (del inglés *forward scatter*), indicativa del tamaño celular, en escala lineal.

2. Migración e injerto de las células madre en la CO humana

Detectamos células marcadas con MIRB en los implantes ováricos de todos los animales que recibieron BMDSC o células CD133 (Figura 43A). En ambos casos, estas células se detectaron ya en D1 tras la infusión celular, si bien representando solo alrededor de un 0,1-0,2 % del total de células ováricas. En D7, la presencia de las células inyectadas en los implantes se incrementó, especialmente en el grupo BMDSC donde supusieron un $1,6 \pm 0,8$ %. A D14 aún detectamos un porcentaje considerable de células MIRB-positivas, si bien este fue menor que el registrado en D7 tanto en el grupo BMDSC como en el grupo CD133 (Figura 43B). En todos los casos, las células MIRB-positivas se localizaron principalmente alrededor de vasos sanguíneos y, en menor frecuencia, cerca de folículos primordiales y primarios, incluso en contacto con las CG. En ninguno de los implantes ováricos del grupo control detectamos células MIRB-positivas (Figura 43A-B).

A



B

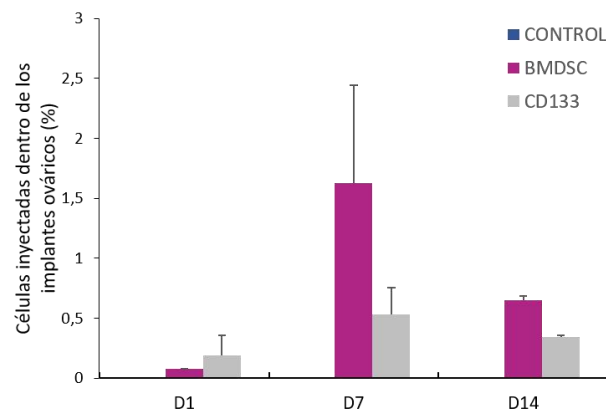


Figura 43. Presencia de las células inyectadas en los implantes de corteza ovárica humana. A) Tinción *Prussian Blue* de los implantes ováricos mostrando la presencia de células marcadas con Ion Molloy-Rodamine B (MIRB, azules) en los grupos BMDSC y CD133. Barra de escala= 50 μ m. B) Porcentaje de células MIRB-positivas (células inyectadas) en los implantes ováricos obtenidos en día 1 (D1), D7 y D14 tras la infusión celular. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

Por otro lado, analizamos si las células inyectadas eran capaces de migrar y anidarse en otros órganos además de en los implantes de CO humana. Mediante tinción *Prussian Blue*, descartamos la presencia de células MIRB-positivas en cerebro, hígado y riñón (Figura 44). Además, mediante PCR para el gen p53 humano descartamos la presencia de células inyectadas en la médula ósea de los animales. Así, el resultado de esta PCR fue negativo (ausencia de amplicón p53 humano) en las muestras de médula femoral de todos los ratones tratados con BMDSC y CD133 humanas.

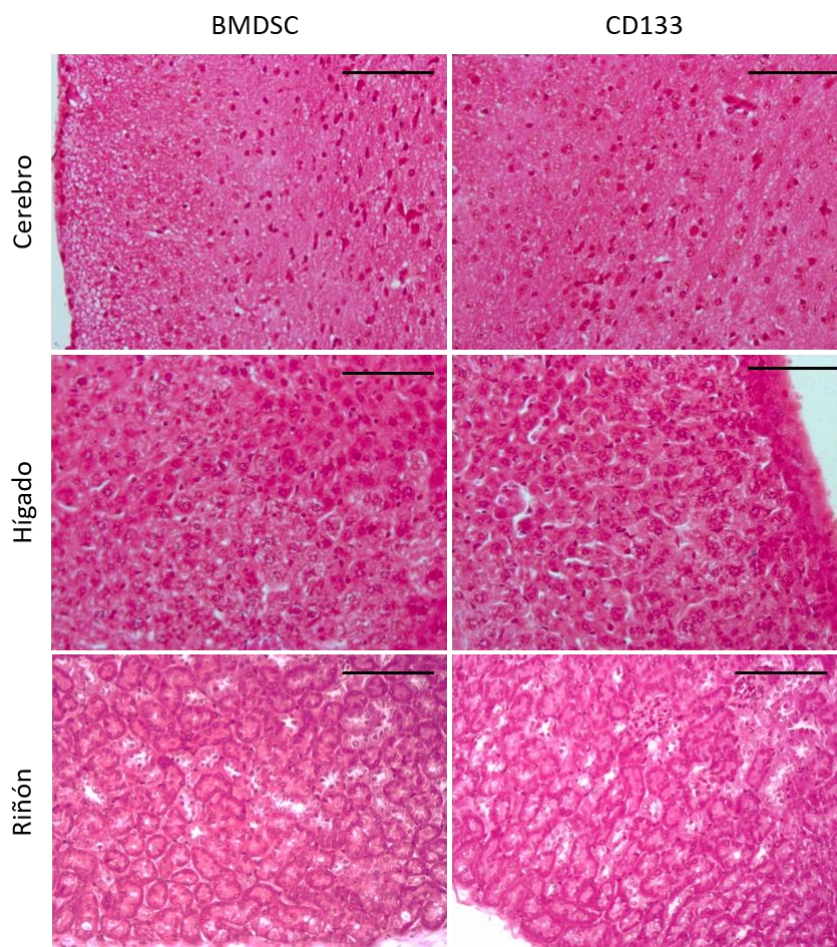


Figura 44. Presencia de células inyectadas en otros órganos. Tinción *Prussian blue* de cerebro e hígado de los animales tratados con BMDSC y células CD133. No se observó en ningún caso células marcadas con Ion Molday-Rodamina B (azules), descartándose la presencia de células inyectadas en estos órganos murinos. Barra de escala= 50 μ m.

3. Análisis de la reserva ovárica y del desarrollo folicular

Una vez demostrada la presencia de las células madre en el tejido ovárico humano, pasamos a analizar sus efectos sobre el desarrollo folicular. En primer lugar, analizamos la densidad folicular total en los implantes de CO humana, no detectándose ninguna

diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos experimentales, tal y como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Densidad folicular en los implantes de tejido ovárico humano.

Grupo experimental	D0 (folículos/mm³)	D1	D7	D14
Control		5,2±0,0	1,9±0,04	0,7±0,2
BMDSC	9,0±5,7	4,2±0,0	3,7±1,5	6,2±1,9
CD133		9,4±1,5	5,7±3,6	2,2 ±1,4

Se representan los valores como media±desviación estándar. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad folicular entre los implantes de los distintos grupos experimentales ni en día 1 (D1), ni en D7 ni en D14 tras la infusión celular. El valor indicado como D0 hace referencia al valor de densidad folicular de los fragmentos de CO humana antes de su xenotrasplante.

Por otro lado, evaluamos el porcentaje y densidad de los folículos en crecimiento. En ninguno de los implantes de CO se detectaron folículos más allá del estadio secundario. No obstante, transcurridos 14 días desde la infusión celular detectamos una mayor proporción de folículos en crecimiento en los grupos BMDSC y CD133 en comparación con su respectivo grupo control (Figura 45A). Este incremento fue estadísticamente significativo en el caso de los implantes tratados con la población completa de BMDSC ($p=0,04$), pero no en el caso de los que recibieron exclusivamente la fracción celular CD133 ($p=N.S$). Además, solo observamos folículos secundarios en los implantes de CO humana de los animales que recibieron células madre (grupos BMDSC y CD133), no detectándose en ningún caso folículos en este estadio en el grupo control, en el que solo encontramos folículos primordiales y primarios (Figura 45B-C). Concretamente, en los implantes del grupo BMDSC los folículos secundarios se empezaron a detectar ya en D7, si bien su máxima representación se observó en D14. Por el contrario, en los implantes del grupo CD133 no detectamos folículos secundarios hasta D14, siendo su número inferior al detectado en el grupo BMDSC (Figura 45C).

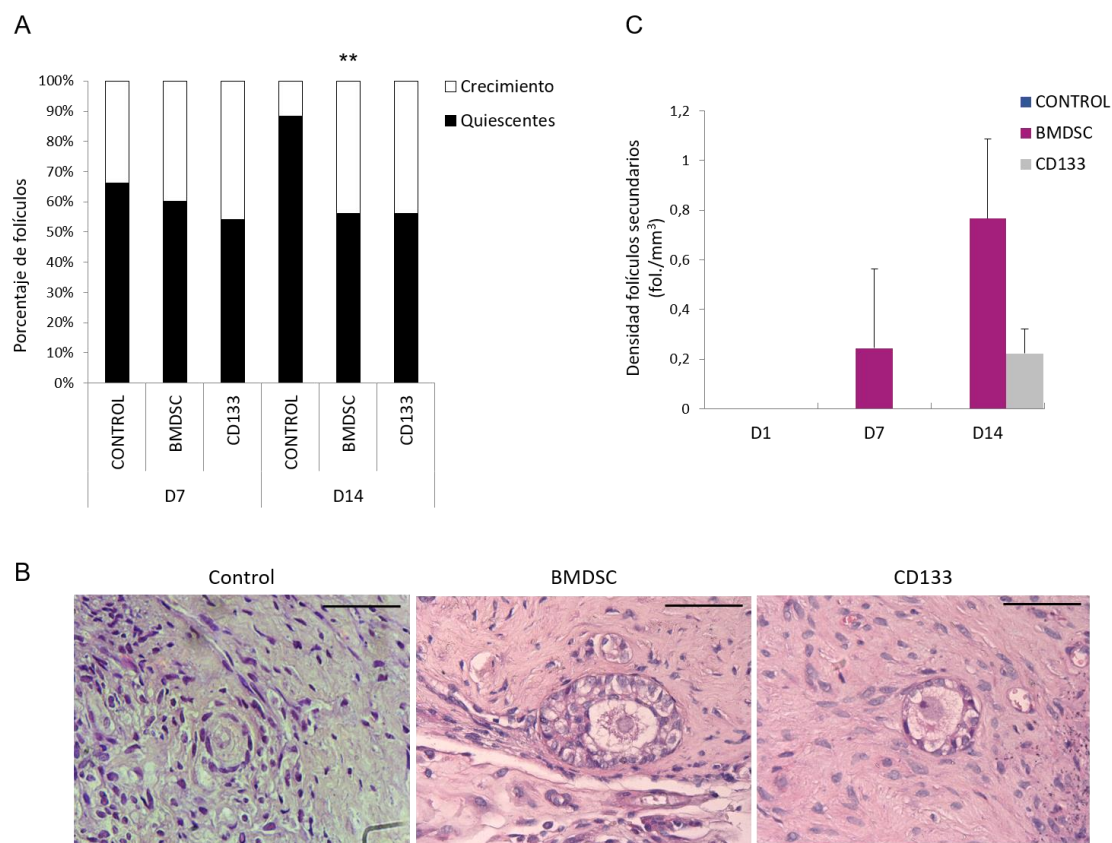


Figura 45. La infusión de BMDSC promovió el crecimiento folicular a estadio secundario en tejido ovárico humano. A) Distribución de las poblaciones foliculares en los distintos grupos experimentales a día 7 (D7) y D14 tras la infusión celular. La administración de BMDSC y de células CD133 incrementó el porcentaje de folículos en crecimiento en D14, siendo este incremento respecto al grupo control solo estadísticamente significativo en el caso de la población completa de BMDSC. B) Secciones de los implantes ováricos teñidas con hematoxilina-eosina. Solo detectamos folículos secundarios en los implantes de los animales que recibieron células madre, especialmente en aquellos tratados con la población completa de BMDSC. Barra de escala= 50 μ m. C) Cuantificación de la densidad de folículos secundarios en los distintos grupos experimentales y en los distintos tiempos de análisis (D1, D7 y D14). ** $p < 0,05$ vs. grupo Control-D14. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

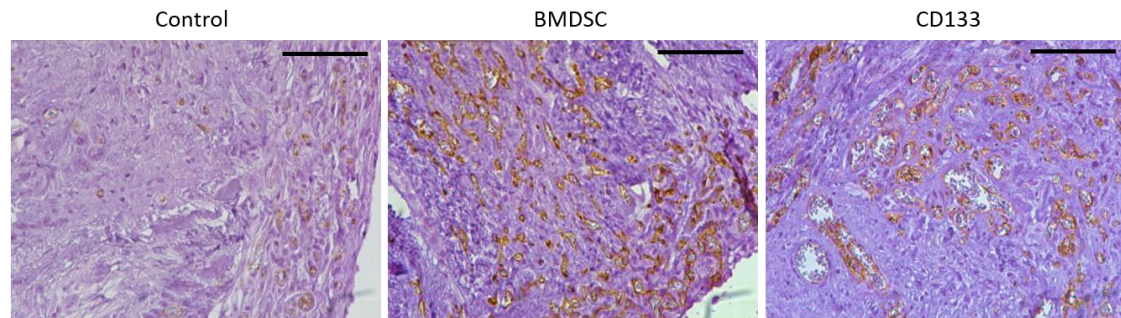
En concordancia con este resultado, al analizar la activación folicular mediante RT-qPCR de los componentes principales de la ruta PI3K-Akt, detectamos en los implantes tratados con BMDSC una sobreexpresión de los genes *Akt* (D7 fc:3,7 \pm 2,3; $p=0,03$ y D14 fc:34,8 \pm 29,2; $p=0,03$) y *Foxo3* (D7 fc:14,4 \pm 9,6; $p=0,03$ y D14 fc: 8,8 \pm 2,0; $p=0,03$) respecto al grupo control (fc: 1), tanto a D7 como a D14. Por el contrario, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos genes entre el grupo CD133 y el grupo control en ninguno de los tiempos analizados.

4. Análisis de la vascularización en los implantes de CO

Al evaluar histológicamente la vascularización en los implantes de CO humana, observamos que tanto la infusión de BMDSC como la de su fracción CD133

incrementaban la densidad de vasos sanguíneos en el tejido ovárico (Figura 46A). El incremento en la MVD tras la infusión celular se observó tanto a D7 como a D14 (Figura 46B), siendo solo estadísticamente significativo en el grupo BMDSC ($p=0,04$ a D7; $p=0,03$ a D14, vs. su respectivo grupo control).

A



B

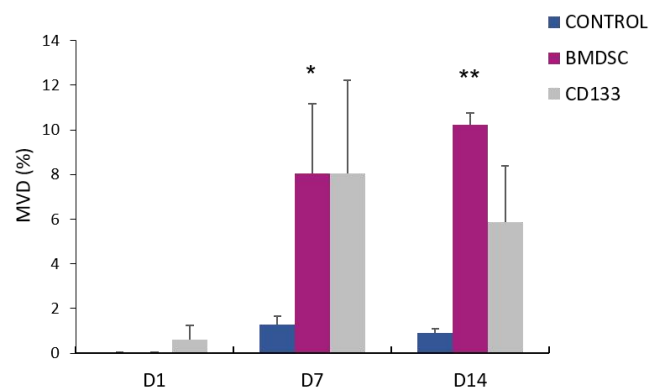


Figura 46. Incremento en la vascularización de los implantes ováricos humanos tras la infusión de BMDSC. A) Inmunohistoquímica frente al marcador endotelial CD31 (marrón). Barra de escala= 100 μ m B) Cuantificación de la densidad microvascular (MVD) a partir de la inmunohistoquímica frente a CD31. La infusión de BMDSC, y también de su fracción CD133, incrementó la MVD tanto a día 7 (D7) como a D14. Este incremento respecto al grupo control fue solo estadísticamente significativo al infundir toda la población de BMDSC. * $p<0,05$ vs. grupo Control-D7. ** $p<0,05$ vs. grupo Control-D14. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

Por otro lado, con el objetivo de determinar la contribución del huésped (ratón) y el donante (humano) a la formación de vasos sanguíneos, analizamos la expresión de los transcritos *Cd31* humano y *Cd31* murino mediante RT-qPCR. Tanto a D7 como a D14, observamos un incremento de la expresión del *Cd31* murino en los grupos BMDSC y CD133 en comparación con sus respectivos grupos control. Concretamente, en D7 registramos un fc de $288,5 \pm 190,2$ para el grupo BMDSC ($p=0,05$) y un fc de $61,7 \pm 51,6$ en el caso del grupo CD133 ($p=N.S$). En D14, el fc del grupo BMDSC respecto al

grupo control fue de $122,8 \pm 159,9$ ($p=0,042$), mientras que el del grupo CD133 fue de $9,2 \pm 8,5$ ($p=N.S.$). En cuanto a la expresión del gen *Cd31* humano, detectamos también un incremento en D14 en los implantes tratados con BMDSC respecto a los controles (fc: $13,8 \pm 13,4$; $p=0,04$).

5. Análisis de la proliferación en los implantes de CO

Mediante tinción inmunohistoquímica del marcador de proliferación Ki67 (Figura 47A), detectamos un incremento de la proliferación en los implantes ováricos del grupo BMDSC respecto al grupo control. Este incremento se empezó a detectar en D7, si bien se hizo mayor y estadísticamente significativo en D14 ($p=0,034$). Por el contrario, la infusión de la fracción CD133 no fue capaz de mejorar la proliferación celular, no detectándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control independientemente del tiempo transcurrido tras la infusión celular (Figura 47B).

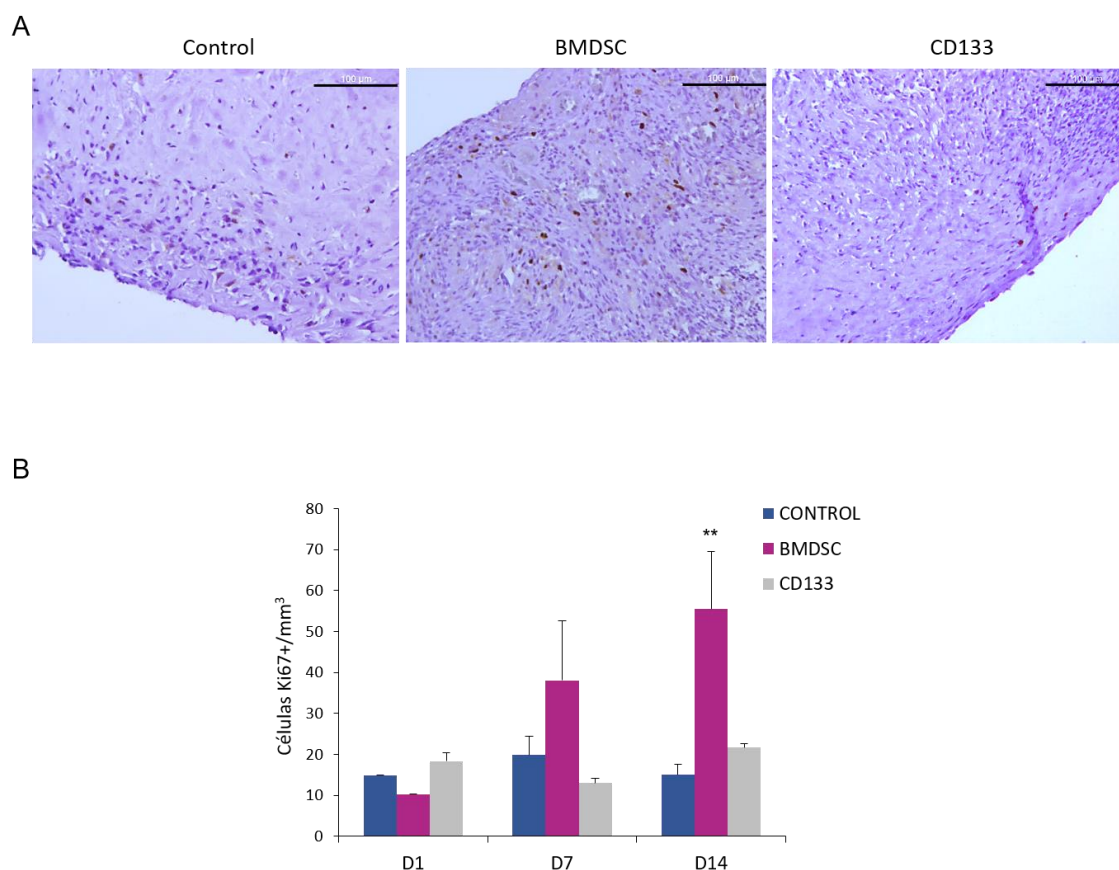


Figura 47. Las BMDSC incrementaron la proliferación en el estroma ovárico humano. A) Inmunohistoquímica frente al marcador de proliferación Ki67 (marrón). Barra de escala=100 µm. B) Cuantificación del número de células proliferativas (Ki67+) en los implantes ováricos humanos. La administración de BMDSC incrementó la proliferación celular 14 días después del tratamiento (D14). ** $p<0,05$ vs. grupo Control-D14. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [201].

6. Efectos de la infusión de células madre sobre la secreción de estradiol

Con el objetivo de determinar si la infusión celular tenía algún efecto sobre la función hormonal de los implantes ováricos humanos, analizamos los niveles plasmáticos de estradiol mediante ELISA. A D7, detectamos un incremento en los niveles plasmáticos de dicha hormona en los animales tratados con BMDSC en comparación con los animales control ($p=0,02$). Por el contrario, la infusión de la fracción CD133 no mejoró los niveles de estradiol (Figura 48).

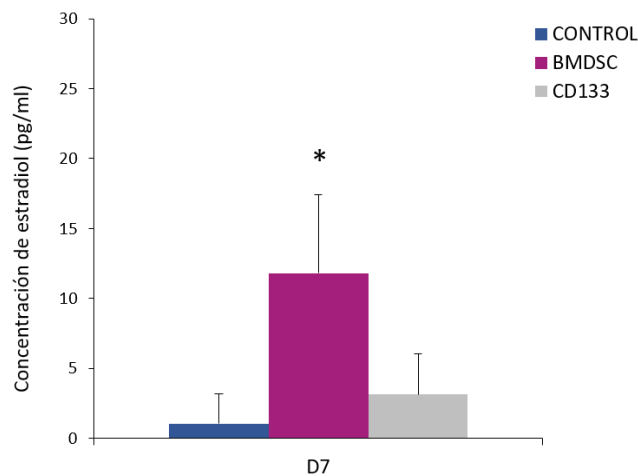


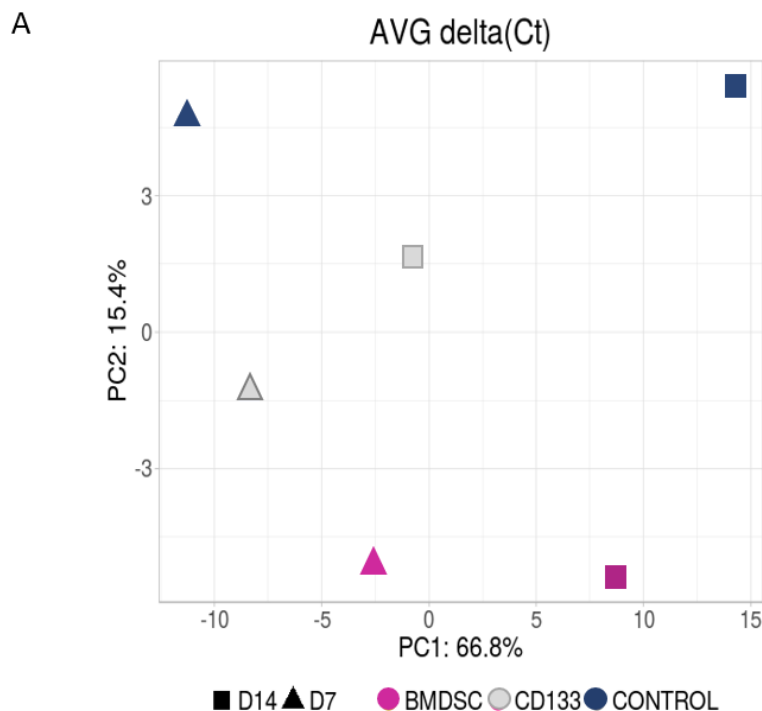
Figura 48. Incremento en los niveles de estradiol tras la administración de BMDSC. Cuantificación mediante ELISA de los niveles plasmáticos de estradiol de los distintos grupos experimentales en D7. Los ratones tratados con BMDSC mostraron un incremento en los niveles de esta hormona en comparación con el grupo control.

7. Caracterización transcriptómica de los efectos inducidos por las células madre en tejido ovárico humano

Con el fin de evaluar los mecanismos y/o genes responsables de los efectos regenerativos de las células madre en el tejido ovárico humano, analizamos la expresión génica mediante matrices basadas en RT-qPCR.

Considerando conjuntamente los genes analizados en los distintos *arrays*, el PCA mostró una clara separación entre las diferentes condiciones experimentales, sugiriendo un comportamiento transcriptómico diferente en función del tiempo (D7, D14) y el tipo de tratamiento (BMDSC, CD133). Específicamente, la componente principal 1 (PC1, del inglés *principal component*) estaba relacionada con el tiempo transcurrido desde la infusión celular y explicaba el 66,8% de la variabilidad. Por su parte, la PC2 estaba

relacionada con el tipo celular inyectado y explicaba el 15,4% de la variabilidad (Figura 49A).



B

Genes diferencialmente expresados	BMDSC-D7 vs. Control-D7	CD133-D7 vs. Control-D7	BMDSC-D14 vs. Control-D14	CD133-D14 vs. Control-D14
Total	26	42	66	53
Up-regulados	8	2	64	37
Down-regulados	18	40	2	16

Figura 49. Efectos transcriptómicos de las células madre en el tejido ovárico humano. A) Análisis de componentes principales considerando conjuntamente los genes de las distintas matrices. En este análisis de reducción de dimensiones se observó una clara separación entre tiempos y tipo de tratamiento celular. B) Número de genes regulados (up- y down-regulados) por ambos tratamientos celulares en día 7 (D7) y D14.

En la figura 49B se muestra el número de genes regulados por los distintos tratamientos en los distintos tiempos, tanto a nivel de aumento de expresión (up-regulación) como de disminución de la expresión (down-regulación). El mayor efecto de la infusión celular en la CO humana se observó en el grupo BMDSC-D14, con 66 genes afectados (64 de ellos up-regulados). Como se puede observar en la Tabla 8, a D7 no observamos

diferencias entre tratamientos en cuanto al porcentaje de genes up-regulados. No obstante, a D14 observamos una mayor up-regulación en los implantes del grupo BMDSC que en los del grupo CD133. Además, en ambos grupos (BMDSC y CD133) la proporción de genes up-regulados se incrementó significativamente de D7 a D14. El patrón contrario observamos al analizar la down-regulación, siendo el porcentaje de genes down-regulados menor en el grupo BMDSC que en el CD133, tanto a D7 como a D14. Asimismo, en ambos grupos detectamos una reducción significativa de la down-regulación de D7 a D14 (Tabla 8).

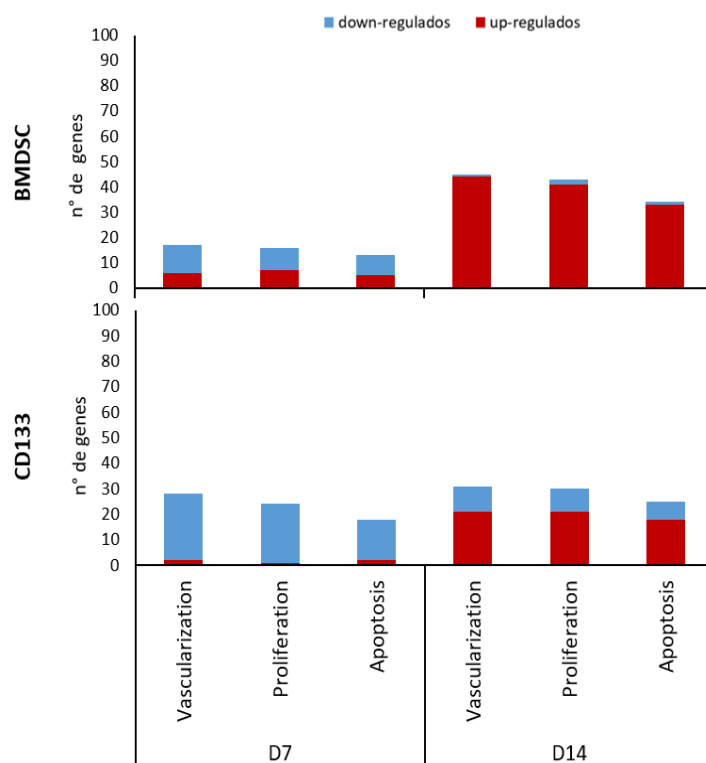
Tabla 8. Tabla de contingencia de la proporción de genes up- y down-regulados por los distintos tratamientos a los distintos tiempos de análisis.

	Genes up-regulados		p-value entre tiempos
	D7	D14	
BMDSC	8%	64%	p<0.01
CD133	2%	37%	p<0.01
p-value entre tratamientos	p=N.S	p<0.01	

	Genes down-regulados		p-value entre tiempos
	D7	D14	
BMDSC	18%	2%	p<0.01
CD133	40%	16%	p<0.01
p-value entre tratamientos	p<0.01	p<0.01	

El 97% de los genes regulados por las BMDSC y las CD133 estaban involucrados en funciones asociadas con el desarrollo folicular como la vascularización, proliferación y/o apoptosis. En todos estos procesos biológicos se observó una misma tendencia a nivel de regulación génica. Concretamente, detectamos una up-regulación de todas estas funciones a D14 tanto en el grupo BMDSC como en el CD133. Sin embargo, las BMDSC up-regularon un mayor número de genes por función que las CD133 (Figura 50A).

A



B

Tratamiento	D7				D14			
	Vascularización		Proliferación		Vascularización		Proliferación	
	Efecto transcriptómico	Incremento MVD	Efecto transcriptómico	Incremento área proliferativa	Efecto transcriptómico	Incremento MVD	Efecto transcriptómico	Incremento área proliferativa
BMDSC	65%	8%	62%	25%	68%	9%	65%	41%
CD133	67%	7%	57%	No diferencias	58%	5%	57%	6%

Figura 50. Efectos de la infusión celular en los procesos de vascularización, proliferación y apoptosis. A) Número de genes implicados en vascularización, proliferación y apoptosis up-regulados y down-regulados por las BMDSC y las CD133. B) Comparación entre los efectos transcriptómicos observados en los procesos de vascularización y proliferación y los resultados histológicos. El efecto transcriptómico sobre la vascularización se expresa como número de genes regulados implicados en este proceso respecto al número total de genes regulados. Los efectos histológicos previos sobre este proceso se muestran como la diferencia entre la densidad microvascular (MVD) en el grupo en cuestión y la MVD en el grupo control correspondiente. Del mismo modo, el efecto transcriptómico sobre la proliferación se expresa como número de genes regulados implicados en este proceso respecto al número total de genes regulados. Finalmente, el efecto histológico sobre la proliferación se representa como la diferencia entre el área proliferativa (Ki67+) en el grupo en cuestión y la del grupo control correspondiente.

Como se puede observar en la Figura 50B, la magnitud del efecto transcriptómico sobre los procesos de vascularización y proliferación fue consistente con los resultados histológicos previos. Así, el mayor efecto transcriptómico sobre estos dos procesos se

observó en los implantes del grupo BMDSC-D14, que fue el grupo en el que detectamos un mayor incremento en la MVD de los implantes, así como un mayor aumento en el área proliferativa respecto al grupo control. Además, observamos que los cambios transcriptómicos en la proliferación derivaban en efectos histológicos pequeños o inexistentes en el grupo CD133, pero no en el grupo BMDSC (Figura 50B).

En cuanto a los genes afectados por los distintos tratamientos (Anexo I), KL fue el gen más up-regulado por las BMDSC (fc: 8,78 en D14), mientras que el inhibidor de metalopeptidasas 1 (TIMP1, del inglés *tissue inhibitor of metallopeptidases 1*) fue el gen más up-regulado por las CD133 (fc: 13,10 en D14). Para profundizar más en la similitud/diferencia de los efectos de ambos tratamientos celulares, comparamos los genes up- y down-regulados por cada uno de ellos. En D7, los grupos BMDSC y CD133 no mostraron ningún solapamiento en cuanto a los genes up-regulados. No obstante, compartieron 17 genes down-regulados (Figura 51A). En D14, detectamos 29 genes cuya expresión aumentó exclusivamente en el grupo BMDSC. Entre ellos KL, THSP1, quinasa de Janus 1 (JAK1, del inglés *Janus kinase 1*), TIMP3 y PDGFA (fc: 8,78; 2,84; 4,15; 4,35 y 2,47, respectivamente). Sin embargo, 35 genes fueron up-regulados tanto por las BMDSC como por las CD133. Además, todos los genes down-regulados por las BMDSC lo fueron también por las CD133 (Figura 51A). El análisis ORA considerando los genes up-regulados a D14 reveló 18 rutas KEGG afectadas exclusivamente por las BMDSC. Entre ellas destacaron las rutas de maduración ovocitaria, linaje celular hemotopoyético, contracción del músculo liso vascular así como distintas rutas relacionadas con las sinapsis nerviosas (Figura 51B). También reveló 74 rutas KEGG afectadas por ambos tratamientos (BMDSC y CD133). Entre estas rutas KEGG comunes encontramos las rutas de señalización PI3K-Akt, FoxO, JAK-STAT, VEGF, GnRH, así como la de regulación del citoesqueleto de actina y la de regulación de la longevidad (Figura 52). En el 84% de estas rutas KEGG comunes, las BMDSC tuvieron un mayor efecto que las CD133, es decir, regularon un mayor número de genes. Solo en las siguientes 12 rutas KEGG comunes ambos tratamientos celulares tuvieron un mismo efecto a nivel de número de genes up-regulados: señalización por calcio, síntesis y secreción de la aldosterona, señalización del receptor RIG-I-like, red intestinal inmune para la producción de IgA, procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, señalización por glucagón, señalización por AMPK, absorción y digestión de

carbohidratos, apoptosis, señalización por adipocitoquinas, regulación de la lipólisis en adipocitos y resistencia a la insulina (Figura 52).

A

			n° de genes	Lista de genes
D7	Up-regulados	BMDSC	8	JAG1, NPR1, KITLG, STAT1, MAPK8, CXCL12, PTN, FOS
		Ambos tratamientos	0	-
		CD133	2	GAB1, MAPK3
	Down-regulados	BMDSC	1	MKNK1
		Ambos tratamientos	17	EDIL3, GSK3A, VEGFA, BCAR1, GPI, CXCL8, BTG1, PDPK1, SERPINE1, RHOB, VEGFC, PIK3CA, HRAS, CD55, TIMP1, FOXO3, CSNK2B
		CD133	23	SHC1, ATF1, STAB1, BMP4, NPR1, KRAS, PDGFA, ANGPTL1, TIMP3, FN1, THBS1, NCK2, CASP3, CCND1, GRN, ANGPT2, ACTR2, PDGFB, RASA1, SERPINF1, EPS8, KITLG, DUSP1
D14	Up-regulados	BMDSC	29	GSK3A, VEGFA, RAF1, NRAS, CXCL8, GPI, BCAR1, CSNK2A1, MAP2K1, PDGFA, SRC, TIMP3, JAG1, STAT3, MAPK1, FN1, THBS1, RHOA, PRKCA, MAPK3, HRAS, ANGPT2, CD59, CD55, TP53, MAP2K4, JAK1, CSNK2B, KITLG
		Ambos tratamientos	35	ATF1, NPR1, ERAP1, TGFB1, MKNK1, AKT2, EGFR, MAPK8, PTN, AKT1, IKBKB, PIK3R1, CASP9, PDGFRA, TIMP2, PDGFD, AKT3, BAD, BCL2, NCK2, CASP3, GRN, MAP2K7, STAT1, GAB1, AGGF1, TIMP1, RNH1, COL18A1, FOXO3, CXCL12, RASA1, SERPINF1, RUNX1, EPS8
		CD133	2	KRAS, PIK3CA
	Down-regulados	BMDSC	0	-
		Ambos tratamientos	2	IGF1, FOS
		CD133	14	EDIL3, PGF, RHOB, CBL, BCAR1, CXCL8, ANGPTL1, PDPK1, TIMP3, HRAS, ANGPT2, CD55, TP53, DUSP1

B

Rutas KEGG up-reguladas exclusivamente tras la infusión de BMDSC

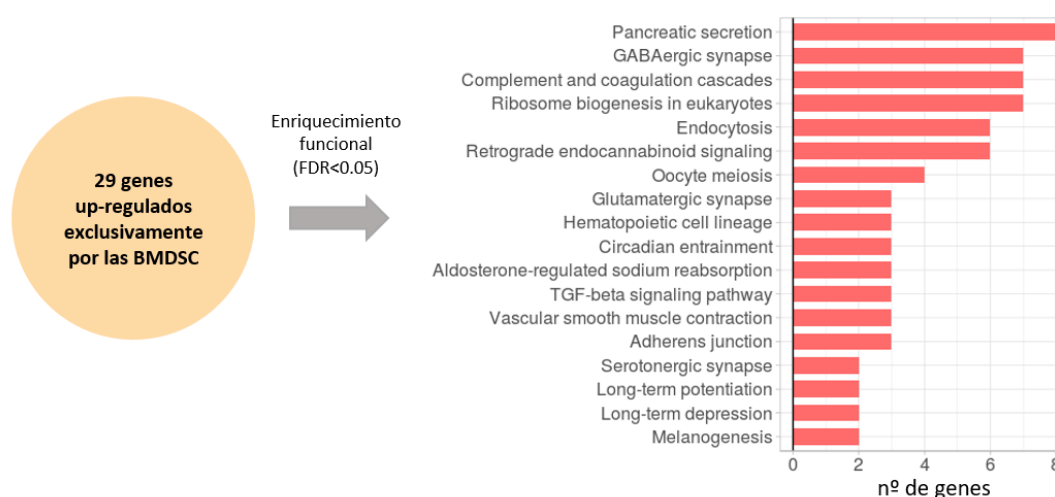


Figura 51. Factores y funciones reguladas por las células madre. A) Lista de genes up- y down-regulados exclusivamente por las BMDSC, por ambos tratamientos o solo por las CD133 tanto a D7 como a D14. B) Enriquecimiento funcional realizado considerando los genes up-regulados específicamente por las BMDSC en D14. Las barras indican el número de genes regulados involucrados en cada una de las rutas KEGG enriquecidas.

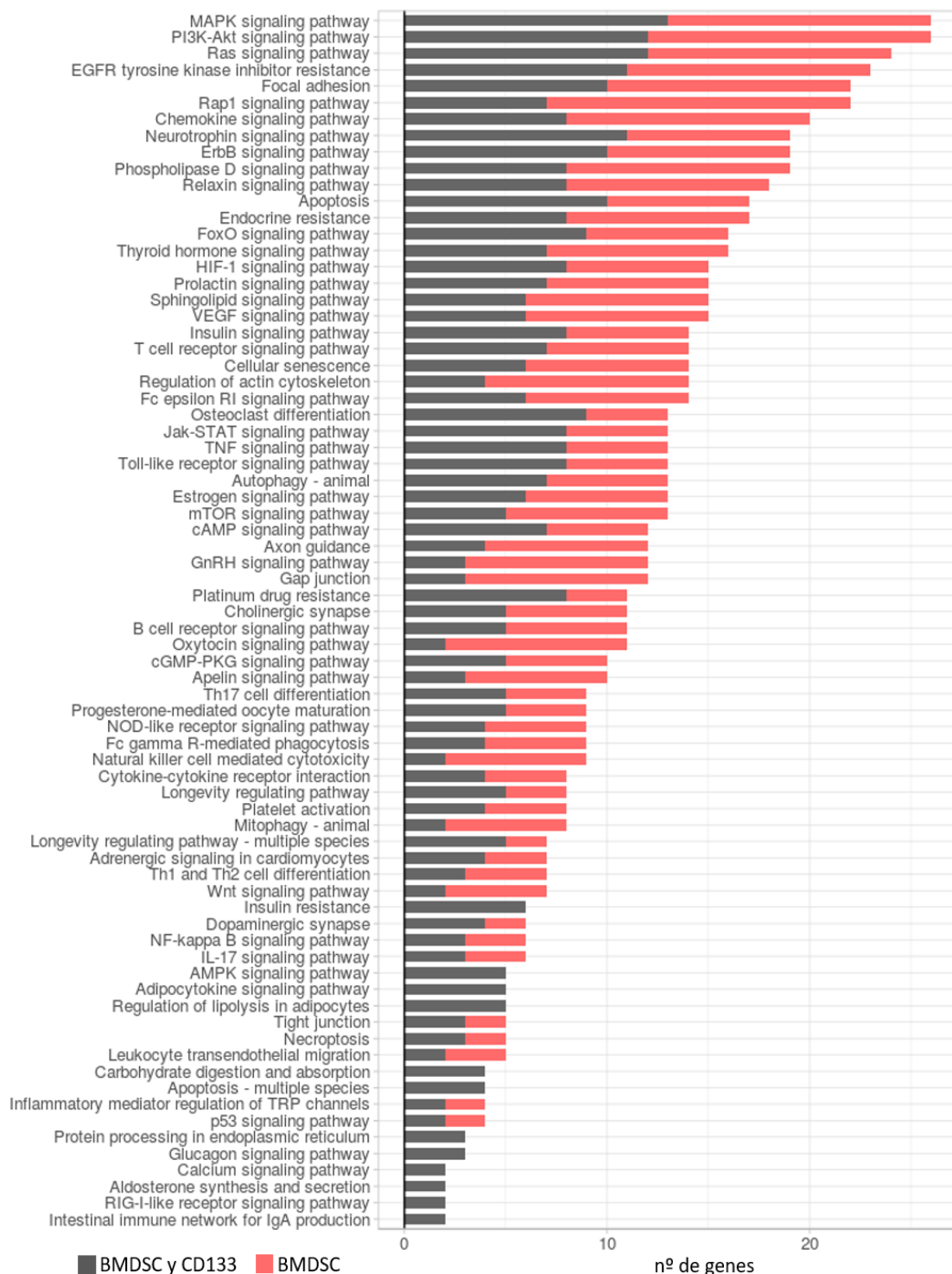


Figura 52. Rutas KEGG enriquecidas tras la infusión de BMDSC y CD133. Se muestran las 74 rutas KEGG enriquecidas significativamente en D14 tanto en el grupo BMDSC como en el grupo CD133. Las barras grises indican el número de genes de cada una de las rutas up-regulados en D14 por ambos tratamientos, mientras que las barras rojas indican el número de genes de cada ruta up-regulados exclusivamente por las BMDSC.

Así pues, un elevado número de rutas fueron reguladas por ambos tratamientos celulares, si bien en la mayoría de ellas las BMDSC tuvieron un mayor efecto. Además, casi 20 rutas fueron reguladas solo por las BMDSC, estando éstas principalmente relacionadas con la diferenciación/autorrenovación de las HSC, el flujo y la presión sanguínea y el sistema nervioso.

D) MECANISMO PARACRINO EN LA REGENERACIÓN OVÁRICA INDUCIDA POR BMDSC

Finalmente, quisimos analizar la importancia de los mecanismos paracrinicos en la regeneración ovárica inducida por las BMDSC. Para ello, evaluamos si existía alguna relación entre la concentración en el plasma de la aféresis de determinados factores solubles secretados por estas células madre y la respuesta positiva de pacientes PR al trasplante autólogo de las mismas.

1. Caracterización de los factores solubles presentes en la aféresis y su influencia en el éxito de la terapia celular

En la Tabla 9 se recoge la media \pm desviación estándar de la concentración en el plasma de la aféresis de los distintos factores analizados, así como sus valores mínimos y máximos. Los valores obtenidos para BMP-6, TNF α e IL-11 fueron inferiores al LOD, excluyéndose por dicho motivo de los posteriores análisis realizados.

Al analizar si existían diferencias en los niveles de estos factores paracrinicos entre las pacientes cuyos parámetros de reserva ovárica se incrementaban tras el tratamiento y aquellas en las que no, obtuvimos varias correlaciones positivas. Tal y como se puede observar en la Figura 53, aquellas pacientes con una respuesta positiva al tratamiento en términos de AMH y de AFC presentaban mayores niveles de FGF-2 que aquellas que no respondieron al tratamiento ($p=0,030$ y $p=0,004$, respectivamente). Por otro lado, detectamos mayores niveles de THSP-1 en aquellas pacientes en las que la AMH se incrementaba tras la infusión de BMDSC ($p=0,049$) (Figura 53), así como una correlación positiva entre el incremento en el AFC y la concentración en el plasma de la aféresis de este factor ($r=0,98$; $p<0,01$).

Tabla 9. Factores paracrinos presentes en la aféresis.

Factor paracrino	Media \pm SD	Rango [Mínimo; Máximo]
FGF-2 (pg/mL)	25,43 \pm 30,08	[<LOD; 108,54]
PDGF-BB (pg/mL)	1137,29 \pm 905,07	[249,53; 3065,24]
IGF-1 (ng/mL)	33,40 \pm 12,15	[16,80; 53,50]
THSP-1 (ng/mL)	2058,62 \pm 1404,48	[480,94; 4497,12]
KL (pg/mL)	298,42 \pm 123,95	[143,06; 551,83]
BMP-6	<LOD	-
TNF α	<LOD	-
IL-11	<LOD	-

Se muestran los niveles medios de los distintos factores paracrinos analizados en el plasma de las muestras de aféresis, así como su mínimo y máximo en las muestras analizadas. LOD=Límite de detección del ELISA empleado para su determinación.

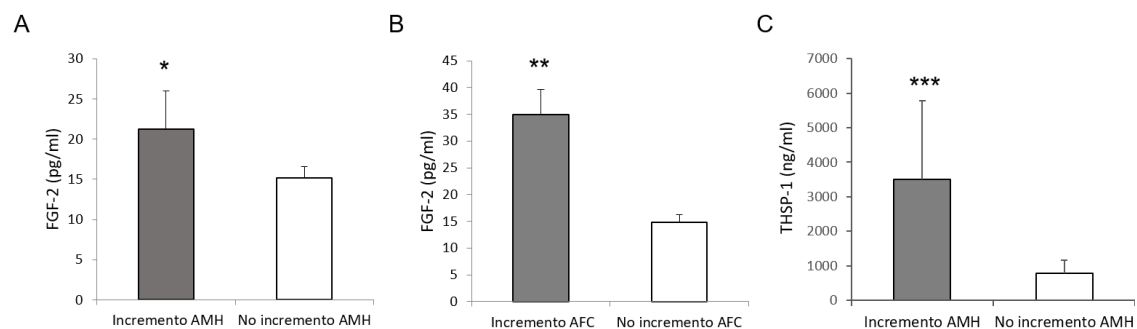


Figura 53. Relación entre los niveles de FGF-2 y THSP-1 y la respuesta positiva a la infusión de BMDSC. A) Los niveles del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2 fueron mayores en las pacientes que mostraron un incremento en los niveles séricos de AMH tras la infusión de BMDSC. B) Los niveles del FGF-2 fueron también mayores en las pacientes que mostraron un incremento en el AFC tras la infusión de BMDSC. C) Los niveles de trombospondina (THSP)-1 fueron significativamente mayores en las pacientes cuyos niveles de AMH se incrementaron tras el tratamiento con BMDSC. * $p=0,030$. ** $p=0,004$. *** $p=0,049$. Adaptada de Herraiz *et al.*, 2018 [213].

Cuando analizamos PDGF-BB, IGF-1 y KL, no detectamos ninguna correlación con la respuesta positiva al tratamiento ni ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes que respondieron y las que no (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración plasmática de los factores de crecimiento solubles estudiados en las pacientes con respuesta positiva a la infusión celular.

Factor paracrino	AMH		AFC	
	Respuesta	No	Respuesta	No
	positiva	respuesta	positiva	respuesta
FGF-2 (pg/mL)	21,3 ± 4,7 ^A	15,2±1,4	34,9±4,7 ^B	14,8±1,5
PDGF-BB (pg/mL)	1440,9 ± 937,4	681,8± 423,1	428,1±948,9	701,1±418,5
IGF-1 (ng/mL)	35,1±12,5	30,8±9,4	34,1±13,6	32,3±7,3
THSP-1 (ng/mL)	3512,4±2276,9 ^C	785,8± 370,0	2722,2±1351,2	2352,1±1953,5
SCF (pg/mL)	268,4 ± 139,2	343,5 ± 46,2	284,4 ± 136,0	319,4±78,0

La concentración de FGF-2 fue mayor en aquellas pacientes cuya AMH (^A p=0,030) y cuyo AFC (^B p=0,004) se incrementó tras el tratamiento en comparación con aquellas pacientes cuya reserva ovárica no varió. Además, la concentración de THSP-1 fue significativamente mayor en aquellas pacientes con una respuesta positiva en términos de incremento de AMH (^C p=0,049).

VII. DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral se han evaluado por primera vez, con resultados prometedores, los efectos de la infusión de BMDSC humanas en el crecimiento folicular y la regeneración del nicho ovárico. Se ha demostrado que estas células madre son capaces de migrar y establecerse en el nicho ovárico promoviendo el crecimiento de los folículos residuales, tanto en ovario murino como en tejido ovárico humano xenotrasplantado. Activan la regeneración de la vascularización ovárica, inhiben la apoptosis y estimulan la proliferación celular. Además, los resultados obtenidos indican que la mejora de la función ovárica y la regeneración del nicho ovárico podrían estar mediadas por factores solubles secretados por las BMDSC actuando de forma paracrina.

Desarrollo y caracterización de modelos animales de DOR-PR y POI inducidos por quimioterapia

Para el estudio de los efectos regenerativos inducidos por las BMDSC en ovario, el primer paso fue establecer modelos animales con diferentes grados de daño ovárico que nos permitiesen realizar una evaluación preclínica de esta estrategia terapéutica, así como analizar los mecanismos implicados.

En las últimas décadas, se han desarrollado distintos modelos de POI [195]. No obstante, hasta la presente tesis doctoral no existía en la literatura ningún modelo de condiciones de daño ovárico menos severas como DOR y PR, cuya incidencia ha crecido considerablemente en los últimos años [214]. Debe tenerse en cuenta que POI y DOR representan dos entidades clínicas separadas de pacientes que difieren a nivel de diagnóstico y que, por lo tanto, requieren un manejo terapéutico distinto. Así pues, DOR es una condición en la cual disminuye el potencial reproductivo normal del ovario, pudiendo estar causada por distintas condiciones que afectan al ovario, aunque en la mayoría de los casos es una consecuencia de la edad [73]. Por el contrario, las pacientes con POI presentan un daño ovárico más severo, así como otros desafíos además de los problemas de fertilidad, como alteraciones cardiovasculares, osteoporosis, deterioro cognitivo y otras alteraciones psicológicas mayores, requiriendo de tratamientos específicos [67]. Así pues, los resultados obtenidos en cualquier modelo de POI no pueden ser extrapolados a pacientes con DOR. Todo ello pone de manifiesto el gran interés y valor clínico de haber establecido y caracterizado en la presente tesis doctoral un modelo murino apropiado de esta condición de daño ovárico moderado en el que poder testar futuras estrategias terapéuticas.

La administración de agentes quimioterapéuticos ha sido ampliamente utilizada para conseguir depleción folicular y establecer modelos de POI [195], siendo los agentes alquilantes Cy y Bu los más comúnmente empleados [215, 216]. Los principales efectos de la toxicidad de estos agentes citotóxicos en el ovario son malformación capilar, fibrosis cortical y reducción del número de folículos [179]. En el desarrollo de modelos animales, la inducción de daño ovárico mediante quimioterapia presenta muchas ventajas respecto a la aproximación *knock-out*, como son una mayor facilidad y rapidez de desarrollo, un menor coste económico y una mayor reproducibilidad. A parte de los agentes quimioterapéuticos, otros químicos como el diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD), con una toxicidad selectiva por los folículos primordiales y primarios, se han utilizado para establecer modelos de POI [217-219]. La administración de VCD no causa toxicidad sistémica, representando al igual que la quimioterapia una manera fácil, rápida y muy económica de obtener modelos de POI. Sin embargo, los ratones con POI inducido por VCD muestran una depleción total de los folículos primordiales, fenotipo no presente en la mayoría de las pacientes con POI en las que, pese al cese de la función ovárica, existen folículos durmientes residuales [91, 220]. Por dicho motivo, este modelo carece de utilidad cuando el objetivo es testar estrategias terapéuticas destinadas a conseguir la activación de este *pool* residual de folículos durmientes, como es la que nos ocupa en la presente tesis doctoral. Además, se ha descrito que el agotamiento de la reserva de folículos primordiales se da incluso cuando se administran dosis bajas de VCD [219], motivo por el que realizar un modelo animal de DOR usando este agente químico sería complicado o no factible. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que los agentes quimioterapéuticos Cy y Bu son utilizados frecuentemente para el tratamiento del cáncer de mama y de enfermedades hematológicas como la leucemia y los linfomas, que son los cánceres que más frecuentes en pacientes en edad fértil [180, 221]. Por todo ello, disponer de modelos de DOR y POI inducidos con Cy y Bu tiene un gran valor en el campo de la investigación y de la medicina traslacional.

De los distintos modelos de POI inducidos por quimioterapia previamente descritos en la literatura, en el presente trabajo se empleó y caracterizó en profundidad aquel en el que se utiliza una dosis elevada de Cy+Bu equivalente a la utilizada en pacientes con cáncer [197, 198]. Este modelo es el utilizado en estudios previos que evalúan los efectos de las células madre en células somáticas y gonadales de la línea germinal

[222, 223]. Sin embargo, no había sido completamente caracterizado. Teniendo en cuenta el carácter dosis-dependiente de la pérdida folicular [224, 225], el modelo de DOR-PR se desarrolló empleando un régimen reducido de Cy+Bu. Mediante esta dosis 10 veces menor conseguimos reproducir en ratones una situación similar al DOR, reduciendo al 55% la reserva ovárica, 81% el número de ovocitos MII, 66,7% el número de embriones, 40% el tamaño de camada y al 43% la vascularización intraovárica respecto a los animales control sin quimioterapia. Todas estas alteraciones fueron menos severas que las observadas en el modelo POI, tal y como ocurre en humanos.

El primer paso en la caracterización fue evaluar los efectos sobre la supervivencia y la salud general de los animales. En cuanto a la tasa de supervivencia, no detectamos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los dos modelos y el grupo control. Este resultado es consistente con estudios previos en los que se describe la dosis empleada para desarrollar el modelo POI como la dosis más alta que induce infertilidad irreversible [226] y permite la supervivencia animal [227]. En nuestro estudio, 3 de 15 ratones del modelo POI murieron durante los primeros tres días tras la administración de quimioterapia. Por el contrario, en el modelo DOR todos los animales sobrevivieron tras el tratamiento quimioterapéutico. La ausencia de mortalidad observada en el modelo DOR pone de manifiesto la menor citotoxicidad de la dosis reducida de quimioterapia, que estaría también respaldada por la menor reducción en el peso corporal, la menor severidad y duración de los efectos sobre el comportamiento y actividad observados en comparación con los ratones POI. Es importante resaltar que los efectos secundarios de los agentes alquilantes se observaron siempre inmediatamente después de su administración y en ningún caso se prolongaron más de 3 días. Tal es así que, en el momento de la hiperestimulación ninguno de los modelos mostró efectos sistémicos a nivel del peso corporal, estado de salud general y patrón de comportamiento respecto a los animales control. Además, en la necropsia, no se detectaron alteraciones ni diferencias macroscópicas entre los animales DOR, POI y control. Por todos estos motivos, es muy improbable que los efectos sobre la fertilidad observados en ambos modelos se deban a una toxicidad sistémica y no a la ovárica.

El ciclo estral se utiliza frecuentemente para analizar el declive reproductivo al ser su longitud y el estado citológico un claro reflejo del perfil hormonal que mantiene la

función ovárica [199]. Por dicho motivo, se decidió monitorizarlo a lo largo del experimento. En el modelo POI, el ciclo estral se detuvo en la fase de diestro. Esto podría ser consecuencia de la reducción significativa en el número de folículos maduros observada, que derivaría en una secreción insuficiente de estradiol y, con ello, en la incapacidad de ciclar con normalidad. La alteración del ciclo se instauró relativamente pronto tras la administración de quimioterapia (de media 8 días), lo que concuerda con estudios previos que constatan una rápida pérdida de la fertilidad tras un tratamiento altamente gonadotóxico [228].

Por otro lado, como en las pacientes con POI [229, 230], las hembras del modelo POI mostraron ovarios de menor tamaño que las controles. En el caso de DOR, las hembras mostraron también ovarios más pequeños, aunque esta reducción no fue tan severa como en el modelo POI. El cambio en el tamaño ovárico se asocia al agotamiento folicular inducido por la quimioterapia ya que, en ambos modelos, detectamos un descenso del número total de folículos, siendo este de menor magnitud en el modelo DOR (DOR: 34% vs. POI: 83%). La depleción afectó principalmente a la población de primordiales, que fueron prácticamente indetectables en la condición POI, en consistencia con lo descrito en mujeres con dicha condición [80, 91, 231]. En la comparación entre ambos modelos, detectamos un mayor número de folículos antrales, MII viables y embriones en el modelo DOR que en el modelo POI. No obstante, el número total de MII fue similar entre ambos modelos. Esto podría deberse a que, pese al gran daño ovárico, quedan en las hembras POI folículos antrales morfológicamente anormales que responden a la estimulación, crecen y dan lugar a ovocitos de calidad muy baja, tal y como confirma el reducido número de embriones observado en este grupo. De hecho, se ha descrito en la literatura que los folículos antrales anormales afectados por la quimioterapia son capaces de alcanzar el estadio preovulatorio y ovular, pero dando lugar a ovocitos de baja calidad [195].

De acuerdo con el fenotipo infértil observado en pacientes con cáncer sometidas a quimioterapia, las hembras del modelo POI no fueron capaces de gestar espontáneamente a pesar de los múltiples cruces realizados durante más de 3 meses. Menos severo fue el grado de infertilidad observado en DOR, donde las hembras fueron capaces de gestar y dar a luz a crías sanas, aunque su tasa de gestación fue menor que la de las controles, al igual que sucede en pacientes DOR-PR. Además, el tamaño de sus camadas también fue menor que en el grupo control.

Por último, teniendo en cuenta que el nicho ovárico se encuentra alterado en pacientes con DOR y POI, decidimos analizar su estado en nuestros modelos. Concretamente, se ha descrito que estas pacientes se caracterizan por presentar una mayor fibrosis en el ovario debido a la diferenciación del tejido ovárico funcional en tejido fibrótico [60] y una menor vascularización intraovárica [76, 232, 233]. De hecho, la baja vascularización se asocia con una función ovárica disminuida [232] y una baja respuesta a la EOC [76, 233], debido a una reducción en la liberación de hormonas gonadotrópicas y factores de crecimiento implicados en la foliculogénesis [234, 235]. Los modelos DOR y POI establecidos en la presente tesis doctoral mostraron una degeneración estromal y una pobre vascularización ovárica, siendo estas alteraciones más moderadas en las ratonas con DOR. Por tanto, ambos modelos recapitulan características del estroma observadas en las pacientes.

Al analizar la apoptosis en las muestras ováricas, se detectó un incremento en el número de células apoptóticas en ambos modelos, aunque no se detectaron diferencias entre modelos. Este resultado podría ser explicado por la reducción de los efectos citotóxicos de la Cy y el Bu a lo largo del tiempo [195]. Por tanto, aunque en el modelo POI tendría lugar un mayor daño y/o apoptosis inmediatamente después de la administración de quimioterapia este no sería detectado en el momento del sacrificio al haber transcurrido ya 25 días, habiendo sido las células dañadas eliminadas del tejido por macrófagos. El mismo fenómeno podría explicar la ausencia de apoptosis en los folículos primordiales en el momento del sacrificio. Así, a pesar de que estos folículos son una de las principales dianas de los agentes alquilantes [236], tras ser dañados estos serían eliminados por los macrófagos, no estando presentes en el tejido ovárico en el momento del análisis (25 días después de la quimioterapia). En cuanto a la localización de las células apoptóticas, éstas se detectaron principalmente en la granulosa de los folículos en crecimiento. Esto es consistente con datos previos que indican que estas células debido a su alto índice mitótico son las más susceptibles al daño en el DNA y a la consiguiente muerte celular programada [179, 190, 191].

La ausencia de apoptosis en los folículos primordiales residuales, unida al hecho que las hembras del modelo DOR fueron capaces de gestar espontáneamente meses después de la administración de quimioterapia, sugiere que al menos en dicho modelo permanecen folículos primordiales sanos, que pueden ser reclutados, crecer hasta el estado maduro, ovular y dar lugar a ovocitos viables y fecundables.

En definitiva, en este estudio se han desarrollado modelos murinos reproducibles de DOR y POI empleando una dosis única, reducida o estándar, de quimioterapia. Ambos modelos animales muestran la mayoría de las características ováricas y reproductivas observadas en pacientes con estas condiciones ováricas independientemente de su causa. Al haber sido establecidos en una cepa murina inmunodeficiente, constituyen herramientas fiables para evaluar terapias de origen humano sin reacciones inmunitarias adversas. Así pues, aunque en la presente tesis doctoral estos modelos se han empleado para evaluar el papel de las BMDSC humanas, podrían ser modelos de gran utilidad para testar otras estrategias terapéuticas que permitan incrementar el potencial reproductivo de pacientes con estas condiciones de daño ovárico.

Efectos regenerativos de la infusión de BMDSC en tejido ovárico murino

Desarrollados los modelos DOR y POI, el siguiente paso fue emplearlos para evaluar los efectos regenerativos de las BMDSC en tejido ovárico murino. Se decidió administrar las BMDSC siete días después del tratamiento quimioterapéutico en base a un estudio previo en el que se establece que el máximo efecto del TMO se da cuando éste se realiza una semana después de la quimioterapia, momento en el cual los fármacos quimioterapéuticos han ejercido sus efectos gonadotóxicos, han sido eliminados del organismo y no existe riesgo de que dañen a las células [223].

En el modelo POI, la inyección de BMDSC fue capaz de reestablecer la regularidad del ciclo estral alterada por la quimioterapia, lo que sugiere un restablecimiento de la secreción de estradiol y progesterona. Además, fue capaz de inducir un incremento de 10 veces en el porcentaje de folículos preovulatorios y de mejorar en un 185% la densidad microvascular. Mejoró también la viabilidad del estroma, promoviendo la proliferación celular y reduciendo la apoptosis. Este amplio rango de efectos positivos podría ser explicado por los distintos tipos celulares presentes en distintas proporciones dentro del conjunto heterogéneo que representan las BMDSC [237]. De hecho, dentro de esta fracción de células mononucleares derivadas de la médula ósea encontramos HSC, MSC y EPC que, en su conjunto, explicarían esta variedad de efectos positivos en el estroma. El aumento de la vascularización local podría deberse en parte a la transdiferenciación de las HSC o de las EPC [238], o también a la secreción de citoquinas proangiogénicas [168], ambos mecanismos de actuación de las células madre adultas ya descritos. Además, las MSC podrían ejercer efectos positivos

mediante la secreción de otros tipos de citoquinas y factores de crecimiento que promueven la proliferación estromal y folicular [239].

Por otro lado, cabe destacar que, en este modelo de daño ovárico severo, la infusión de BMDSC también fue capaz de rescatar los ovocitos residuales no dañados, permitiendo el nacimiento de crías sanas, como demuestra la consecución de hasta tres gestaciones consecutivas. Este resultado es especialmente relevante si se tiene en cuenta que la cepa NOD/SCID empleada en este estudio es de por sí una cepa subfétil, con tasas de gestación inferiores a otras cepas de uso habitual como la C57BL/6 [240]. Por el contrario, las hembras de los grupos control con quimioterapia y las hembras tratadas con PBMNC no fueron capaces de quedar gestantes y dar a luz a crías sanas a pesar de los múltiples intentos de cruce. Como ya se ha comentado, este resultado concordaría con la pérdida completa de fertilidad descrita tras la administración de esta dosis estándar de quimioterapia [223].

Los resultados prometedores obtenidos en este modelo solo pueden extrapolarse a la población limitada de pacientes con POI [241, 242] y no a pacientes añosas con DOR o PR con una condición ovárica alterada [214]. Este grupo creciente de pacientes podría beneficiarse también de los efectos regenerativos de la terapia celular. Por dicho motivo, evaluamos los efectos de la infusión de BMDSC en el modelo DOR previamente descrito. En este modelo, la infusión de estas células madre humanas promovió la activación de los folículos ya existentes, así como su desarrollo hasta el estadio preovulatorio. Además, incrementó la densidad microvascular y la proliferación celular, reduciendo la apoptosis. Al igual que en el modelo POI, el tratamiento con BMDSC fue capaz de revertir los principales efectos de la quimioterapia en el estroma ovárico [179], originando un nicho adecuado para el desarrollo folicular. Relevante fue el hecho de que, incluso en este modelo de menor daño ovárico, la administración de BMDSC incrementase la tasa de ovulación y el tamaño de las camadas tras la administración de BMDSC. Todos estos resultados sugieren que las terapias basadas en BMDSC podrían ser una estrategia terapéutica válida no sólo para las pacientes con POI sino también para aquellas de edad avanzada o que muestran una baja respuesta a la estimulación con gonadotropinas.

Por otro lado, nuestros resultados apoyan la importancia del estado del nicho ovárico para el crecimiento folicular. Así pues, las BMDSC serían capaces de regenerar el nicho ovárico dañado por la quimioterapia, generando así un entorno capaz de activar

y sostener el crecimiento folicular lo que conlleva la recuperación de la capacidad natural de ovulación. La relevancia del nicho ovárico en el crecimiento folicular fue ya planteada en el experimento de Niikura y colaboradores [243], en el que se demostró que la exposición del tejido ovárico de ratonas envejecidas a un entorno joven, mediante su trasplante en individuos jóvenes, derivaba en un incremento del número de folículos en crecimiento.

Como ya se ha comentado con anterioridad, las células mononucleares de sangre periférica movilizada utilizadas en este estudio (BMDSC) son una población heterogénea que, si bien está enriquecida en EPC, HSC y MSC, también contiene linfocitos y monocitos [124]. Por dicho motivo, además de incluir en nuestro estudio un grupo control tratado con suero salino, incluimos un grupo tratado con las células mononucleares normalmente presentes en sangre periférica, es decir linfocitos y monocitos (grupo PBMNC). A diferencia de lo que ocurrió con las BMDSC, en ninguno de los dos modelos de daño ovárico se observó infiltración celular, mejora del potencial reproductivo a corto ni a largo plazo, ni regeneración del estroma tras la infusión de PBMNC. Este resultado pone de manifiesto que los efectos regenerativos observados tras la infusión de BMDSC son debidos a las células madre y no a los linfocitos y monocitos presentes en sangre.

Efectos regenerativos de la infusión de BMDSC en tejido ovárico humano

Pese a los resultados prometedores obtenidos mediante estos modelos, no debemos olvidar que existen diferencias estructurales y funcionales entre tejido ovárico murino y humano [244]. Por ello, y con el objetivo de entender las potenciales implicaciones clínicas de las BMDSC, decidimos validar sus efectos en CO humana de pacientes PR. Cabe resaltar que este estudio es el único publicado hasta el momento en el campo de la terapia celular que utiliza tejido ovárico humano. Al igual que en el tejido murino, las BMDSC fueron capaces de migrar y de establecerse en los implantes de CO humana, localizándose principalmente cerca de los vasos sanguíneos y de folículos, incluso en contacto con las CG. De hecho, observamos que la infusión de BMDSC promovía el crecimiento de los escasos folículos existentes a estadio secundario e incrementaba la vascularización en un 1.112% y la proliferación celular en un 357%. Además, tras el tratamiento con BMDSC detectamos un incremento en la secreción de estradiol, lo que concuerda con el incremento de folículos en crecimiento observado. En este sentido, cabe destacar que los ratones fueron ovariectomizados, por lo que

todo el estradiol detectado fue secretado por los implantes humanos. La relevancia de estos resultados es mayor si se tiene en cuenta que las muestras de CO empleadas en este estudio se obtuvieron durante la cesárea de mujeres PR embarazadas, en las que el crecimiento folicular, ya de por sí disminuido, se encuentra detenido debido a la gestación. De hecho, en las muestras control no se detectó ningún folículo más allá del estadio primario.

La capacidad de las BMDSC de migrar y anidar en el tejido ovárico, es decir de hacer *homing*, sugiere que probablemente no sea necesaria su inyección directa en el ovario para inducir efectos positivos. Este resultado es muy relevante a la hora de diseñar aproximaciones menos invasivas para la práctica clínica. La localización específica de las BMDSC cerca de vasos sanguíneos y folículos, pero no formando parte de éstos, respalda que los efectos positivos observados podrían ser parcialmente explicados por la secreción de factores paracrinos que actuarían sobre los vasos sanguíneos y células foliculares adyacentes, estimulando la formación de nuevos vasos y promoviendo la activación y proliferación folicular. En ningún caso detectamos marcaje MIRB-positivo en los ovocitos, descartando cualquier posibilidad de oogenesis *de novo*. Este resultado concuerda con los datos publicados por Eggen y colaboradores, quienes mediante un modelo de parasimbiosis demostraron que las células de la médula ósea no generaban nuevos ovocitos [245], rechazándose así la teoría de oogenesis *de novo* postulada por Johnson y su equipo en 2004 [215]. La acción paracrina de las BMDSC estaría, además, respaldada por los distintos factores solubles secretados por células madre que encontramos diferencialmente expresados tras la infusión celular. Entre ellos, cabe destacar KL, que fue el factor más up-regulado por las BMDSC catorce días después de la terapia celular. Se ha postulado que KL es un factor clave en la activación folicular, promoviendo la transición de folículo primordial a primario [29] a través de la ruta PI3K-Akt [18]. Así, el desarrollo folicular inducido por las BMDSC podría deberse, al menos en parte, a la secreción de KL. De hecho, la ruta PI3K-Akt fue en nuestro análisis transcriptómico la más afectada por la terapia celular con BMDSC. Esta ruta juega un papel esencial en el control de la activación folicular, estando implicada además en la proliferación y supervivencia celular [27, 28]. Otros factores solubles que encontramos up-regulados tras la infusión celular fueron distintos miembros de la familia TIMP. De entre ellos, destaca TIMP2, presente en altos niveles en el plasma de cordón umbilical (tanto humano como de ratón) y que

tiene propiedades regenerativas, siendo su administración capaz de revitalizar la función del hipocampo en ratones de edad avanzada [246]. En base a ello, es posible que este factor, u otros de la familia, como TIMP1 y/o TIMP3, tengan un papel importante en el rejuvenecimiento ovárico inducido por las BMDSC.

De todos los efectos regenerativos observados tras la infusión de BMDSC, los más relevantes fueron el crecimiento folicular y la angiogénesis, tanto en el tejido ovárico humano como murino. Esto es consistente con observaciones previas que muestran que el éxito del desarrollo folicular y la ovulación está determinado por la existencia de una red apropiada de vasos sanguíneos necesaria para mantener la proliferación y la función endocrina de las células foliculares [247]. De hecho, se ha demostrado mediante el empleo de ultrasonido tridimensional *power-Doppler* que el flujo sanguíneo ovárico es menor en mujeres arias y con PR que en normorespondedoras [232]. La red vascular juega además un papel clave en la formación de la cavidad antral y en la formación del cuerpo lúteo en animales sanos [248]. En la presente tesis doctoral, se ha observado que ambos parámetros (proporción de folículos antrales y de cuerpos lúteos) se incrementan tras la administración de BMDSC en ambos modelos de daño ovárico. Esto podría ser, por tanto, consecuencia de la formación de nuevos vasos sanguíneos inducida por las BMDSC, como previamente se ha descrito en otros rganos reproductivos como el endometrio [98]. Este concepto de efectos indirectos o paracrinos de las BMDSC sobre la vasculatura ovárica queda respaldado por el hecho de que en la CO humana xenotrasplantada, tanto el huésped (ratón) como el donante (humano) contribuyeron al establecimiento de nuevos vasos sanguíneos, como demuestra el incremento de expresión de los genes *Cd31* murino y humano en los implantes ováricos del grupo BMDSC.

En el modelo de CO humana xenotrasplantada, además de evaluar los efectos del conjunto heterogéneo de BMDSC, nos propusimos comprobar si su fracción CD133+ era la principal responsable de los efectos regenerativos observados. Decidimos testar esta población de HSC debido a su capacidad regenerativa en otros tejidos [249], incluyendo otros rganos reproductivos [98, 99]. Observamos que la infusión de células CD133+ estimulaba el crecimiento folicular a estadio secundario y mejoraba la vascularización de los implantes de CO. No obstante, los efectos regenerativos fueron menores, estadísticamente no significativos y tardaron más tiempo en aparecer que en el grupo tratado con el conjunto completo de BMDSC. Por lo tanto, aunque las células

CD133+ tienen propiedades regenerativas en tejidos humanos [99, 249-251] y murinos [98, 252], otras células o componentes presentes en el conjunto de BMDSC contribuirían de forma específica a mejorar el crecimiento folicular y el nicho ovárico. Unas posibles candidatas serían las MSC, pues se ha descrito que tienen efectos regenerativos en distintos órganos, incluido el ovario [97, 102, 105, 109, 110, 114, 117-119, 168]. Así pues, el tratamiento de la población heterogénea de BMDSC presentaría ventajas respecto al empleo de una fracción específica de las mismas, sumándose los efectos de sus subpoblaciones y dando lugar a un mayor rango y magnitud de efectos beneficiosos en el ovario. Además, el empleo del conjunto de BMDSC conlleva una menor manipulación celular ya que no existe selección celular ni se requiere cultivo. No está, por lo tanto, considerado como terapia celular avanzada, lo que hace más sencillo su aplicación clínica. De hecho, distintos autores hayan reportado su preferencia por la población entera de BMDSC [153].

Aunque diversos estudios previos demuestran que la administración de MSC de diferentes orígenes (endometrial, menstrual, adiposo, amniótico, médula ósea y cordón umbilical) es capaz de promover la función ovárica de ratones tratados con agentes quimioterapéuticos [97, 100-120], existen problemas asociados a la futura aplicación clínica de estos tipos celulares y a su origen en mujeres. Así, hoy en día se requieren procedimientos de expansión para conseguir un número clínicamente relevante de MSC independientemente de su origen [253]. Estos procedimientos pueden suponer la acumulación de alteraciones genómicas y epigenómicas, así como la degeneración del potencial progenitor de las células madre humanas [121]. En el caso de células menstruales, amnióticas y de cordón umbilical no existe una fuente de origen autólogo en pacientes con POI y en algunas pacientes de edad reproductiva avanzada. Estas limitaciones podrían explicar porque, a pesar de los numerosos estudios en modelos animales, hasta el momento se hayan realizado muy pocos estudios en humanos destinados a evaluar la recuperación de la función ovárica mediante infusión de células madre. De hecho, hasta la fecha solo se han publicado un total de tres trabajos en humanos, todos ellos con MSC autólogas de la médula ósea [254-256]. Aunque los resultados obtenidos parecen prometedores, cabe destacar que en todos ellos las células madre se obtuvieron mediante un método invasivo (aspiración de la médula ósea mediante punción de la cresta ilíaca) y fueron cultivadas antes de su trasplante o infusión. Mediante las BMDSC se solventarían todas estas limitaciones, ya que su

obtención en un número clínicamente relevante no requiere de ningún procedimiento de expansión, pudiéndose obtener fácilmente y de forma no invasiva tras su movilización a sangre periférica con G-CSF. Además, el origen autólogo de estas células es una opción para todo tipo de pacientes, incluidas aquellas con POI. La población de BMDSC tiene también otras ventajas que la hacen especialmente atractiva como tipo celular de elección en la terapia regenerativa. Así, se han registrado muchos datos que respaldan la seguridad del trasplante o infusión de estas células en el tratamiento de distintas enfermedades [154, 155], habiendo acumulado los hematólogos décadas de experiencia clínica. Asimismo, las BMDSC poseen una gran capacidad de hacer *homing* en los sitios donde existe un daño, siendo capaces de migrar y sobrevivir en los mismos durante mucho tiempo [157-161]. Esta capacidad hace posible que los efectos regenerativos de las mismas puedan extenderse durante mucho tiempo tras su infusión. En definitiva, el conjunto heterogéneo de BMDSC representa una opción excelente para la terapia celular: pueden ser fácilmente movilizadas y aisladas de una fuente autóloga a altas concentraciones de forma no invasiva. Por último, cabe destacar que en este estudio se han utilizado BMDSC de origen humano para regenerar el ovario. Teniendo en cuenta que la composición del conjunto de BMDSC, así como sus propiedades, pueden variar entre especies, el uso en la presente tesis doctoral de BMDSC de origen humano aporta calidad y fiabilidad a los resultados para una posible extrapolación a humanos. Además, las células empleadas fueron obtenidas de pacientes PR, uno de los grupos de pacientes que podrían beneficiarse de la terapia descrita. Esto es importante, pues se ha descrito que la composición de la aféresis (y, por tanto, la de las BMDSC) cambia según los niveles hormonales y el ciclo menstrual [257].

Relevancia del mecanismo paracrino en la regeneración ovárica inducida por BMDSC

Partiendo de las evidencias obtenidas sobre la importancia del mecanismo paracrino en la regeneración ovárica inducida por BMDSC, nos propusimos estudiar si la respuesta positiva de mujeres PR al trasplante autólogo de estas células madre se correlacionaba con la presencia en el injerto de ciertos factores solubles. Para ello, utilizamos las muestras del estudio piloto que nuestro grupo llevó a cabo en mujeres PR tras los estudios experimentales. En este estudio piloto se observó que solo algunas pacientes presentaban una respuesta positiva al tratamiento [213]. Concretamente,

considerando como respuesta positiva a la terapia celular un incremento en el AFC total ≥ 3 folículos y/o dos incrementos consecutivos en los niveles de AMH tras la infusión de BMDSC, en el 81,3 % de las pacientes se incrementaron los marcadores de reserva ovárica [213]. La variabilidad en la respuesta a la terapia podría ser explicada por la gran heterogeneidad existente dentro de la población de pacientes PR, cuya baja respuesta puede estar causada no solo por una baja reserva ovárica sino también por otras condiciones como, por ejemplo, una baja sensibilidad a las gonadotropinas [258, 259]. No obstante, pensamos que podría ser interesante analizar si se correlacionaba y/o asociaba a la presencia de determinados factores solubles en el plasma de la aféresis.

Observamos una asociación positiva entre los niveles de FGF-2 en la aféresis y la mejora tanto en los niveles de AMH como en el AFC. El FGF-2 y su receptor se expresan en folículos humanos en etapas tempranas, jugando un papel clave en una amplia variedad de funciones ováricas, entre las que se incluyen la producción de estradiol [260] y la transición de folículo primordial a primario [31], así como la diferenciación [261] y apoptosis [262] de la granulosa. De hecho, la sobreexpresión de dicho factor de crecimiento se ha asociado con un incremento en el desarrollo folicular y en la neoangiogénesis del nicho ovárico [44, 263-265], esencial para que los folículos se activen, crezcan y maduren [247]. Recientemente, el FGF-2 ha sido, además, identificado como uno de los factores clave en los efectos terapéuticos de las células madre menstruales en ovarios de ratón dañados por quimioterapia [116]. Concretamente, se ha reportado que la inhibición de este factor mediante siRNA revierte el incremento en los niveles de estradiol, el descenso en los niveles de FSH y el descenso en la fibrosis intersticial observado tras la infusión de células madre menstruales [116]. También se ha descrito que el FGF-2 promueve en roedores los efectos terapéuticos mediados por el trasplante de MSC tras daño cerebral y que sus niveles disminuyen con la edad [266].

Asimismo, detectamos una asociación positiva entre los niveles de THSP-1 en el plasma de la aféresis y el incremento en los niveles de AMH tras el trasplante autólogo de BMDSC. Cabe destacar que el gen que codifica para la THSP-1 fue además uno de los genes que encontramos up-regulado tras la infusión de BMDSC en nuestro modelo de xenotrasplante de CO humana. Dicho factor es un importante mediador de la angiogénesis ovárica y de la foliculogénesis [267, 268], y su sobreexpresión ha sido

asociada con los efectos regenerativos inducidos por la terapia celular con CD133 en un modelo animal de enfermedad endometrial [98]. Por tanto, la THSP-1 podría tener efectos beneficiosos en el ovario al regular la red vascular de este órgano, que tan importante es para el desarrollo folicular. Todos estos resultados en su conjunto, reforzados por los resultados transcriptómicos obtenidos en el modelo de xenotrasplante de CO, establecen el efecto paracrino de las células madre como uno de los mecanismos clave en la regeneración ovárica, tal y como se ha descrito ya para otros órganos como el corazón [168]. De hecho, este mecanismo regenerativo independiente de célula sería el responsable de la reparación celular inducida por la inyección de plasma joven rico en factores de crecimiento en organismos envejecidos o con daño en distintos órganos [269-271]. La sangre de individuos jóvenes es rica en factores de crecimiento cuyos niveles se reducen con la edad, aumentando los niveles de factores inflamatorios [246]. Así pues, es posible que el daño tisular y el envejecimiento sean atribuibles, al menos en parte, a cambios en los factores sanguíneos [86] y que puedan ser revertidos mediante su administración. Sin embargo, pese que la administración de factores paracrinos podría ser de gran utilidad terapéutica, hay tener en cuenta que la infusión de células madre y la consiguiente presencia de éstas en los ovarios permitiría una continua secreción de estas moléculas, induciendo efectos mayores y más duraderos.

En resumen, en la presente tesis doctoral se ha observado que las BMDSC humanas promueven la función ovárica, restableciendo la ciclicidad estral, incrementando el número de MII, de embriones, así como de crías sanas en ratones con sub- o infertilidad inducida por quimioterapia. Los efectos regenerativos se han validado en tejido ovárico humano en dónde se ha observado un incremento del crecimiento folicular, de la secreción de estradiol, de la vascularización local y de la proliferación del estroma, siendo todos ellos mayores tras la infusión de la población completa de BMDSC que de la subpoblación CD133. Además, según los resultados obtenidos, estos efectos regenerativos estarían mediados por la secreción de distintos factores solubles que actuarían de forma paracrina promoviendo la activación folicular, la angiogénesis y la proliferación. En base a todo ello, nuestros resultados plantean que la inducción de la angiogénesis ovárica y el rescate folicular mediante terapias autólogas con BMDSC podría ser una alternativa para incrementar el potencial reproductivo de pacientes de edad reproductiva avanzada, mujeres tratadas con

quimioterapia, y mujeres PR en las que el nicho ovárico no es capaz de mantener el crecimiento de su ya limitada reserva folicular.

Relevancia, limitaciones y perspectivas futuras

En la actualidad, un 15% de las parejas son consideradas infértiles y requieren de técnicas de reproducción asistida para conseguir su deseada maternidad [87]. El retraso del momento en el que las mujeres deciden llevar a cabo su proyecto reproductivo, así como el aumento de las tasas de supervivencia frente al cáncer, explica que cada vez sean más las pacientes que acuden a las clínicas de reproducción asistida con problemas de fertilidad asociados a un envejecimiento o daño ovárico. Todas estas pacientes, que tienen en común problemas de fertilidad asociados a una reserva ovárica deficiente, siguen representando un reto clínico pues, aunque existen diversas intervenciones terapéuticas dirigidas a incrementar su potencial reproductivo [272, 273], hasta la fecha todas presentan una eficacia limitada y poco reproducible. De hecho, actualmente la única alternativa clínica real a la que pueden optar dichas mujeres es a la ovodonación [274], que puede ser aceptada o no dependiendo de criterios morales, éticos y religiosos [275] y que está restringida en muchos países. Por tanto, hoy en día existe una necesidad real de desarrollar intervenciones terapéuticas que permitan regenerar las gónadas dañadas o envejecidas, es decir, rejuvenecer los ovarios.

En la presente tesis doctoral hemos evaluado con resultados prometedores una posible alternativa terapéutica para dichas pacientes: la infusión de BMDSC. Los resultados obtenidos tanto en tejido murino como humano indican que las BMDSC podrían ser una alternativa clínica para rescatar los folículos residuales, favorecer su desarrollo y mejorar el nicho ovárico en pacientes con función ovárica disminuida. Sin embargo, los resultados han sido obtenidos mediante el empleo de modelos animales, por lo que antes de considerar esta estrategia como una alternativa real en la práctica clínica será necesario llevar a cabo ensayos clínicos apropiados con pacientes DOR, PR y/o POI. En este sentido, cabe destacar que los resultados obtenidos en el estudio piloto llevado a cabo por nuestro grupo con pacientes PR son muy prometedores y respaldan la idoneidad de esta técnica [213]. De hecho, en este estudio piloto el trasplante autólogo de estas células madre (técnica ASCOT), incrementó los biomarcadores de reserva ovárica en el 81% de las pacientes, habiéndose conseguido un total de 5 embarazos (3 de ellos espontáneos) y 3 recién nacidos vivos en pacientes con mal pronóstico. La

infusión de BMDSC presentaría ciertas ventajas frente a otras estrategias que se están evaluando en la actualidad para incrementar el potencial reproductivo de pacientes con problemas de reserva ovárica, como es la estrategia de activación *in vitro* (IVA) y fragmentación ovárica [91]. Así, el protocolo de IVA y fragmentación ovárica requiere de una o más intervenciones quirúrgicas para extraer y posteriormente reimplantar el tejido ovárico. Además, implica la incubación del tejido ovárico con sustancias (estimuladores de AKT e inhibidores de PTEN) que se sabe que tienen un efecto oncogénico *in vivo* y que, por tanto, podrían inducir malignidad [276]. Por el contrario, la infusión de BMDSC sería una potencial estrategia terapéutica menos invasiva, que no requiere cultivo *in vitro*.

En este estudio se ha caracterizado la población de BMDSC. No obstante, dicha caracterización solo se ha realizado para el linaje hematopoyético y no, en cambio, para el linaje mesenquimal. Cabe destacar que, aunque las HSC son las mayoritariamente movilizadas mediante el tratamiento farmacológico con G-CSF [277], en los últimos años se ha descrito que dicho factor podría ser también capaz de movilizar MSC de la médula ósea a sangre periférica [278, 279]. Debido a ello, y teniendo en cuenta los efectos regenerativos de la MSC ya descritos en distintos órganos, en el futuro será útil caracterizar la presencia y abundancia de MSC en el conjunto de BMDSC. Una vez cuantificadas, podría ser de interés aislar dicha población de células madre y testarla en los modelos animales de DOR y POI y /o en el modelo de xenotrasplante de CO humana como se ha hecho en la presente tesis doctoral con la subpoblación celular CD133+. De esta manera podríamos conocer si las MSC por sí solas son capaces de recapitular todos o parte de los efectos regenerativos del conjunto heterogéneo de BMDSC.

Finalmente, en la presente tesis doctoral las BMDSC inyectadas fueron detectadas dentro del ovario, cerca de vasos sanguíneos y folículos, pero no formando parte de estos. Este resultado, unido a la up-regulación tras la infusión celular de determinados genes que codifican para factores solubles (como KL, THSP1, PDGFA y distintos miembros de la familia TIMP) y a la correlación observada entre la presencia de ciertos factores solubles en la aféresis (el FGF-2 y la THSP-1) y el incremento de los biomarcadores de reserva ovárica tras la infusión de BMDSC en pacientes PR, apoyan la idea de que los efectos regenerativos observados estarían mediados por mecanismos paracrin. No obstante, el papel regenerativo de dichos factores en el ovario no ha

sido evaluado en este estudio. Por ello, en el futuro será de gran interés validar el papel de estos factores mediante su inyección o bloqueo en modelos animales. La identificación y validación de los factores paracrinos que median la regeneración ovárica por BMDSC podrían llevar al desarrollo de una herramienta capaz de predecir la respuesta de pacientes PR, añosas o POI a la terapia con BMDSC. Además, también podría permitir el desarrollo de una estrategia no-invasiva de rejuvenecimiento ovárico basada en un cóctel comercial de factores que no requeriría del uso de células madre.

VIII. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son:

1. La administración de una dosis reducida de quimioterapia (12 mg/kg de Cy + 1,2 mg/kg de Bu) permite obtener un modelo murino de DOR-PR, con unas características ováricas y una función reproductiva comparable al fenotipo observado en pacientes con DOR.
2. La administración de una dosis elevada de quimioterapia equivalente a la empleada en pacientes (120 mg/kg de Cy + 12 mg/kg de Bu) permite obtener un modelo de POI que presenta una condición de daño ovárico más severa que la observada en el modelo de DOR y comparable a la de mujeres con POI.
3. Estos modelos de DOR y POI serían apropiados para evaluar estrategias terapéuticas destinadas a incrementar el potencial reproductivo y conseguir la maternidad de este tipo de pacientes.
4. Las BMDSC promueven la activación de los folículos residuales durmientes y su posterior crecimiento en los modelos murinos de DOR-PR y POI. Además, regeneran el nicho ovárico dañado por la quimioterapia. Estos efectos regenerativos de las BMDSC derivan en un incremento del potencial reproductivo de las hembras de ambos modelos de daño ovárico.
5. Las células madre, y no los monocitos y linfocitos presentes en el conjunto de BMDSC, son las responsables de los efectos regenerativos observados tras la infusión celular.
6. Las BMDSC migran y se establecen en tejido ovárico humano de mujeres PR al ser administradas por vía intravenosa, localizándose principalmente cerca de vasos sanguíneos y de folículos. Por tanto, su futura aplicación clínica no requeriría su inyección directa en ovario, siendo así una aproximación no invasiva.
7. En tejido ovárico humano de mujeres PR, las BMDSC son capaces de rescatar los folículos primordiales residuales. Además, estimulan la vascularización y proliferación del estroma ovárico, generando así un nicho apropiado para soportar el crecimiento de los folículos activados.
8. La fracción de células CD133+ no es capaz de recapitular todos los efectos del conjunto completo de BMDSC. Por tanto, deben existir otras subpoblaciones celulares que contribuyen a estos efectos.
9. Los efectos de las BMDSC sobre el ovario podrían estar mediados por factores solubles como KL, FGF-2 y THSP-1, que serían secretados por estas células madre

y actuarían de forma paracrina sobre los folículos/ovocitos y/o sobre las células del estroma ovárico.

10. El rescate folicular y la regeneración del nicho ovárico mediante terapias autólogas con BMDSC podría ser una alternativa para mejorar el potencial reproductivo de pacientes de edad avanzada, mujeres con POI y mujeres PR en las que el nicho ovárico no es capaz de mantener el crecimiento de su ya limitada reserva folicular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Pereda J, Zorn T, Soto-Suazo M. Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc Res Tech.* 2006;69(6):386-395.
2. Mamsen LS, Brochner CB, Byskov AG, Mollgard K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):771-778.
3. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction.* 2013;146(6):R205-215.
4. Forabosco A, Sforza C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertil Steril.* 2007;88(3):675-683.
5. Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res.* 1961;24:495-507.
6. Maheshwari A, Fowler PA. Primordial follicular assembly in humans--revisited. *Zygote.* 2008;16(4):285-296.
7. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod.* 2008;23(3):699-708.
8. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(2):58-65.
9. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000;21(2):200-214.
10. Greenwald GS. Of eggs and follicles. *Am J Anat.* 1972;135(1):1-3.
11. Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod.* 2009;81(1):16-25.
12. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010;140(4):489-504.
13. Jorge S, Chang S, Barzilai JJ, Leppert P, Segars JH. Mechanical signaling in reproductive tissues: mechanisms and importance. *Reprod Sci.* 2014;21(9):1093-1107.

14. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod.* 2012;27(6):1801-1810.
15. Vanderhyden B. Molecular basis of ovarian development and function. *Front Biosci.* 2002;7:d2006-2022.
16. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:195-220.
17. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science.* 2002;296(5576):2178-2180.
18. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009;30(5):438-464.
19. Zhang H, Risal S, Gorre N, et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol.* 2014;24(21):2501-2508.
20. Hirshfield AN. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod.* 1989;41(2):309-316.
21. Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod.* 1998;3(3):183-195.
22. Sternlicht AL, Schultz RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool.* 1981;215(2):191-200.
23. Schultz RM, Letourneau GE, Wassarman PM. Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev Biol.* 1979;73(1):120-133.
24. Junger MA, Rintelen F, Stocker H, et al. The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol.* 2003;2(3):20.

25. Reddy P, Liu L, Adhikari D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008;319(5863):611-613.
26. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003;301(5630):215-218.
27. Li J, Kawamura K, Cheng Y, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(22):10280-10284.
28. Novella-Maestre E, Herraiz S, Rodriguez-Iglesias B, Diaz-Garcia C, Pellicer A. Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127786.
29. Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 1999;140(9):4262-4271.
30. Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*. 2003;144(8):3329-3337.
31. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):123-130.
32. van Wezel IL, Umapathysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol*. 1995;115(2):133-140.
33. Wang TR, Yan LY, Yan J, et al. Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during growth in vitro. *Hum Reprod*. 2014;29(3):568-576.
34. Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;214(1-2):19-25.
35. Nilsson EE, Detzel C, Skinner MK. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*. 2006;131(6):1007-1015.

36. Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod.* 2006;75(3):421-433.
37. Louhio H, Hovatta O, Sjoberg J, Tuuri T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(8):694-698.
38. Stubbs SA, Webber LJ, Stark J, et al. Role of Insulin-like growth factors in initiation of follicle growth in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):3298-3305.
39. Wood AM, Lambert A, Higham V, et al. Insulin-like growth factor-I stimulated growth and progesterone production by granulosa-lutein cells. Lack of interaction with physiological concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1993;8(11):1813-1818.
40. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 2003;69(4):1265-1272.
41. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 2001;65(4):994-999.
42. Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, et al. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev.* 2004;69(2):159-163.
43. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 1998;12(12):1809-1817.
44. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 2005;11(5):461-471.
45. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383(6600):531-535.

46. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000;25(3):279-283.
47. Liu K. Stem cell factor (SCF)-kit mediated phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase signaling during mammalian oocyte growth and early follicular development. *Front Biosci.* 2006;11:126-135.
48. Cheng Y, Kawamura K, Takae S, et al. Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development. *FASEB J.* 2013;27(6):2175-2184.
49. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188(1-2):65-73.
50. Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:9.
51. Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Mol Endocrinol.* 2012;26(7):1158-1166.
52. Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;225(1-2):29-36.
53. Farookhi R, Desjardins J. Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 1986;47(1-2):13-24.
54. Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril.* 1999;71(3):405-414.
55. Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 1994;9(2):188-191.
56. Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa ESAC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol.* 2014;2014:818010.
57. Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol (Paris).* 2010;71(3):132-143.

58. Macklon NS, Fauser BC. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res.* 1999;52(4):161-170.
59. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-1217.
60. Richardson RB, Allan DS, Le Y. Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Exp Gerontol.* 2014;55:80-91.
61. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002;8(2):141-154.
62. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2217-2222.
63. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):193-198.
64. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.* 2008;24(2):86-93.
65. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):206-212.
66. Eichenlaub-Ritter U, Staubach N, Trapphoff T. Chromosomal and cytoplasmic context determines predisposition to maternal age-related aneuploidy: brief overview and update on MCAK in mammalian oocytes. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(6):1681-1686.
67. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev.* 2009;30(5):465-493.
68. Treloar AE, Boynton RE, Behn BG, Brown BW. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil.* 1967;12(1 Pt 2):77-126.
69. Soules MR, Sherman S, Parrott E, et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril.* 2001;76(5):874-878.

70. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1342-1346.
71. Buyuk E, Seifer DB, Younger J, Grazi RV, Lieman H. Random anti-Mullerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2369-2372.
72. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Discordances between follicle stimulating hormone (FSH) and anti-Mullerian hormone (AMH) in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:64.
73. Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(1):17-23.
74. Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2004;19(4):893-898.
75. Guerif F, Lemseffer M, Couet M, Gervereau O, Ract V, Royere D. Serum antimullerian hormone is not predictive of oocyte quality in vitro fertilization. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2009;70(4):230-234.
76. Pellicer A, Ballester MJ, Serrano MD, et al. Aetiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal serum follicle stimulating hormone levels. *Hum Reprod*. 1994;9(5):806-811.
77. Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;146(1):30-36.
78. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):391-410.
79. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res*. 2007;68(4):196-202.
80. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):787-808.

81. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009;360(6):606-614.
82. Bidet M, Bachelot A, Bissauge E, et al. Resumption of ovarian function and pregnancies in 358 patients with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):3864-3872.
83. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update*. 2013;19(1):26-36.
84. Gunby J, Bissonnette F, Librach C, Cowan L. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2007 results from the Canadian ART Register. *Fertil Steril*. 2011;95(2):542-547.e541-510.
85. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1768-1774.
86. Visser JA, Schipper I, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(6):331-341.
87. Evers JL. Female subfertility. *Lancet*. 2002;360(9327):151-159.
88. Meirow D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;169(1-2):123-131.
89. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5307-5314.
90. Cobo A, Garrido N, Crespo J, Jose R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(4):424-432.
91. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17474-17479.

92. Salooja N, Chatterjee R, McMillan AK, et al. Successful pregnancies in women following single autotransplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. *Bone Marrow Transplant*. 1994;13(4):431-435.
93. Sanders JE, Hawley J, Levy W, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;87(7):3045-3052.
94. Salooja N, Szydlo RM, Socie G, et al. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet*. 2001;358(9278):271-276.
95. Hershlag A, Schuster MW. Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril*. 2002;77(2):419-421.
96. Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(5):1334-1335.
97. Liu J, Zhang H, Zhang Y, et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells*. 2014;37(12):865-872.
98. Cervello I, Gil-Sanchis C, Santamaria X, et al. Human CD133(+) bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1552-1560 e1551-1553.
99. Santamaria X, Cabanillas S, Cervello I, et al. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Hum Reprod*. 2016;31(5):1087-1096.
100. Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy*. 2008;10(4):353-363.
101. Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, et al. Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure. *PLoS One*. 2012;7(3):e32462.

102. Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest.* 2013;93(2):181-193.
103. Liu T, Qin W, Huang Y, Zhao Y, Wang J. Induction of estrogen-sensitive epithelial cells derived from human-induced pluripotent stem cells to repair ovarian function in a chemotherapy-induced mouse model of premature ovarian failure. *DNA Cell Biol.* 2013;32(12):685-698.
104. Wang F, Wang L, Yao X, Lai D, Guo L. Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5):124.
105. Wang S, Yu L, Sun M, et al. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int.* 2013;2013:690491.
106. Sun M, Wang S, Li Y, et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):80.
107. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One.* 2014;9(9):e106538.
108. Liu T, Huang Y, Zhang J, et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem Cells Dev.* 2014;23(13):1548-1557.
109. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med.* 2015;19(9):2108-2117.
110. Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med.* 2015;13:155.
111. Su J, Ding L, Cheng J, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016;31(5):1075-1086.

112. Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell*. 2016;48(4):370-382.
113. Liu T, Li Q, Wang S, Chen C, Zheng J. Transplantation of ovarian granulosalike cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Mol Med Rep*. 2016;13(6):5053-5058.
114. Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2517514.
115. Ding C, Li H, Wang Y, et al. Different therapeutic effects of cells derived from human amniotic membrane on premature ovarian aging depend on distinct cellular biological characteristics. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):173.
116. Wang Z, Wang Y, Yang T, Li J, Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):11.
117. Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):55.
118. Bao R, Xu P, Wang Y, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation rescues premature ovarian insufficiency induced by chemotherapy. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(4):320-326.
119. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health*. 2017;9:441-447.
120. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci*. 2018;25(1):51-63.
121. Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):732-744.
122. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441:1060.

123. Rice CM, Scolding NJ. Autologous bone marrow stem cells--properties and advantages. *J Neurol Sci.* 2008;265(1-2):59-62.
124. Michler RE. Stem cell therapy for heart failure. *Cardiol Rev.* 2014;22(3):105-116.
125. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91(6):501-508.
126. Behbahan IS, Keating A, Gale RP. Bone Marrow Therapies for Chronic Heart Disease. *Stem Cells.* 2015;33(11):3212-3227.
127. Kawashima I, Zanjani ED, Almaida-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood.* 1996;87(10):4136-4142.
128. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med.* 1996;2(12):1329-1337.
129. Michallet M, Philip T, Philip I, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol.* 2000;28(7):858-870.
130. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997;385(6619):810-813.
131. Ferreri NR, Escalante BA, Zhao Y, An SJ, McGiff JC. Angiotensin II induces TNF production by the thick ascending limb: functional implications. *Am J Physiol.* 1998;274(1 Pt 2):F148-155.
132. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000;6(11):1229-1234.
133. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000;290(5497):1779-1782.

134. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95(4):343-353.
135. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
136. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 2004;110(10):1209-1212.
137. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
138. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3213-3218.
139. Lee JH, Kosinski PA, Kemp DM. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res*. 2005;307(1):174-182.
140. Alvarez P, Carrillo E, Velez C, et al. Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *Biomed Res Int*. 2013;2013:312656.
141. Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O, Horisberger B, Bargetzi M, Urbano-Ispizua A. Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(7):575-590.
142. Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(4):485-501.
143. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11):2791-2808.
144. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.

145. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-705.
146. Astori G, Soncin S, Lo Cicero V, et al. Bone marrow derived stem cells in regenerative medicine as advanced therapy medicinal products. *Am J Transl Res*. 2010;2(3):285-295.
147. Donndorf P, Steinhoff G. CD133-Positive Cells for Cardiac Stem Cell Therapy: Current Status and Outlook. *Adv Exp Med Biol*. 2013;777:215-227.
148. Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, et al. A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim/)-CD34+ human cord blood cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9(6):827-840.
149. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-958.
150. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(3):717-725.
151. Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A, et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(1):17-22.
152. Ghodsizad A, Ruhparwar A, Bordel V, et al. Clinical application of adult stem cells for therapy for cardiac disease. *Cardiovasc Ther*. 2013;31(6):323-334.
153. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364(9429):141-148.
154. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000;18(2):307-316.

155. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-1397.
156. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27(23):2775-2783.
157. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*. 2002;1(2):92-100.
158. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003;101(8):2999-3001.
159. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4080-4085.
160. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet*. 2004;363(9419):1432-1437.
161. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):2088-2093.
162. Lescaudron L, Unni D, Dunbar GL. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *Int J Neurosci*. 2003;113(7):945-956.
163. Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000;11(13):3001-3005.
164. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport*. 2004;15(7):1105-1108.
165. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-637.

166. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*. 2003;7 Suppl 3:86-88.
167. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):Ii247-256.
168. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-1219.
169. Gneocchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11(4):367-368.
170. Gneocchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb j*. 2006;20(6):661-669.
171. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084.
172. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H886-893.
173. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(5):678-685.
174. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104(9):1046-1052.
175. Jagarlamudi K, Reddy P, Adhikari D, Liu K. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol*. 2010;315(1-2):1-10.

176. Danilovich N, Maysinger D, Sairam MR. Perspectives on reproductive senescence and biological aging: studies in genetically altered follitropin receptor knockout [FORKO] mice. *Exp Gerontol*. 2004;39(11-12):1669-1678.
177. Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, et al. Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;155(1):62-70.
178. Benedict JC, Miller KP, Lin TM, et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates growth, but not atresia, of mouse preantral and antral follicles. *Biol Reprod*. 2003;68(5):1511-1517.
179. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*. 2013;5(185):185ra162.
180. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist*. 2006;11(5):422-434.
181. Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2583-2592.
182. Meirrow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(4):727-739.
183. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update*. 2006;12(5):519-535.
184. Litzow MR, Perez WS, Klein JP, et al. Comparison of outcome following allogeneic bone marrow transplantation with cyclophosphamide-total body irradiation versus busulphan-cyclophosphamide conditioning regimens for acute myelogenous leukaemia in first remission. *Br J Haematol*. 2002;119(4):1115-1124.
185. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(8):782-793.

186. Petrillo SK, Desmeules P, Truong TQ, Devine PJ. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;253(2):94-102.
187. Meirow D, Dor J, Kaufman B, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1626-1633.
188. Marcello MF, Nuciforo G, Romeo R, et al. Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment. *Cancer.* 1990;66(10):2099-2104.
189. Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, et al. Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med.* 2009;15(10):1179-1185.
190. Lopez SG, Luderer U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(11):1366-1377.
191. Plowchalk DR, Mattison DR. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Reprod Toxicol.* 1992;6(5):411-421.
192. Slater CA, Liang MH, McCune JW, Christman GM, Laufer MR. Preserving ovarian function in patients receiving cyclophosphamide. *Lupus.* 1999;8(1):3-10.
193. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):525-535.
194. Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:18.
195. Zhang T, Yan D, Yang Y, et al. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;81:223-232.
196. Kim SY, Kim SK. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women. 2016;27(2):e22.

197. Grigg AP, McLachlan R, Zaja J, Szer J. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120 mg/kg). *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(10):1089-1095.
198. Hassan M, Andersson BS. Role of pharmacogenetics in busulfan/cyclophosphamide conditioning therapy prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacogenomics*. 2013;14(1):75-87.
199. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327-339.
200. Felicio LS, Nelson JF, Finch CE. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol Reprod*. 1984;31(3):446-453.
201. Herraiz S, Buigues A, Diaz-Garcia C, et al. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertil Steril*. 2018;109(5):908-918 e902.
202. Fransolet M, Henry L, Labied S, et al. Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor. *J Ovarian Res*. 2015;8(14):015-0142.
203. Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum Reprod*. 2010;25(7):1734-1743.
204. Sanchez M, Novella-Maestre E, Teruel J, Ortiz E, Pellicer A. The Valencia Programme for Fertility Preservation. *Clin Transl Oncol*. 2008;10(7):433-438.
205. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodriguez B, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. 2014;101(3):775-784.
206. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.

207. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):Research0034.
208. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2015.
209. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613.
210. Goeman JJ, Bühlmann P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. *Bioinformatics.* 2007;23(8):980-987.
211. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D109-114.
212. Buigues A, Marchante M, Herraiz S, Pellicer A. Diminished Ovarian Reserve Chemotherapy-Induced Mouse Model: A Tool for the Preclinical Assessment of New Therapies for Ovarian Damage. *Reprod Sci.* 2019:1933719119831784.
213. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, et al. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertil Steril.* 2018;110(3):496-505.e491.
214. Ubaldi F, Vaiarelli A, D'Anna R, Rienzi L. Management of poor responders in IVF: is there anything new? *Biomed Res Int.* 2014;2014:352098.
215. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.* 2004;428(6979):145-150.
216. Jiang Y, Zhao J, Qi HJ, et al. Accelerated ovarian aging in mice by treatment of busulfan and cyclophosphamide. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013;14(4):318-324.
217. Mayer LP, Dyer CA, Eastgard RL, Hoyer PB, Banka CL. Atherosclerotic lesion development in a novel ovary-intact mouse model of perimenopause. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(9):1910-1916.
218. Romero-Aleshire MJ, Diamond-Stanic MK, Hasty AH, Hoyer PB, Brooks HL. Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin

resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(3):R587-592.

219. Van Kempen TA, Milner TA, Waters EM. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Res*. 2011;1379:176-187.

220. Zhai J, Yao G, Dong F, et al. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4405-4412.

221. Brydoy M, Fossa SD, Dahl O, Bjoro T. Gonadal dysfunction and fertility problems in cancer survivors. *Acta Oncol*. 2007;46(4):480-489.

222. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell*. 2005;122(2):303-315.

223. Lee H-J, Selesniemi K, Niikura Y, et al. Bone Marrow Transplantation Generates Immature Oocytes and Rescues Long-Term Fertility in a Preclinical Mouse Model of Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(22):3198-3204.

224. Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod*. 1995;52(2):365-372.

225. Meirrow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod*. 1999;14(7):1903-1907.

226. Batchvarov IS, Taylor RW, Bustamante-Marin X, et al. A grafted ovarian fragment rescues host fertility after chemotherapy. *Mol Hum Reprod*. 2016;22(12):842-851.

227. Generoso WM, Stout SK, Huff SW. Effects of alkylating chemicals on reproductive capacity of adult female mice. *Mutat Res*. 1971;13(2):172-184.

228. Skaznik-Wikiel ME, McGuire MM, Sukhwani M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. *Fertil Steril*. 2013;99(7):2045-2054 e2043.

229. Massin N, Gougeon A, Meduri G, et al. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2004;19(11):2555-2560.
230. Massin N, Meduri G, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;282(1-2):95-100.
231. Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder--a plea for universal definitions. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(12):1709-1712.
232. Pan HA, Wu MH, Cheng YC, Wu LH, Chang FM. Quantification of ovarian stromal Doppler signals in poor responders undergoing in vitro fertilization with three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(2):338-344.
233. Battaglia C, Genazzani AD, Regnani G, Primavera MR, Petraglia F, Volpe A. Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders. *Fertil Steril.* 2000;74(4):809-812.
234. Weiner Z, Thaler I, Levron J, Lewit N, Itskovitz-Eldor J. Assessment of ovarian and uterine blood flow by transvaginal color Doppler in ovarian-stimulated women: correlation with the number of follicles and steroid hormone levels. *Fertil Steril.* 1993;59(4):743-749.
235. Bassil S, Wyns C, Toussaint-Demyille D, Nisolle M, Gordts S, Donnez J. The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997;12(6):1240-1245.
236. Yuksel A, Bildik G, Senbabaoglu F, et al. The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depending upon the category of the drugs and the type of granulosa cells. *Hum Reprod.* 2015;30(12):2926-2935.
237. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002;9(10):648-652.

238. Zubair AC, Malik S, Paulsen A, et al. Evaluation of mobilized peripheral blood CD34(+) cells from patients with severe coronary artery disease as a source of endothelial progenitor cells. *Cytotherapy*. 2010;12(2):178-189.
239. Xia J, Luo M, Ni N, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate proliferation and neuronal differentiation of retinal progenitor cells. *PLoS One*. 2013;8(9):e76157.
240. Kumagai K, Kubota N, Saito TI, et al. Generation of transgenic mice on an NOD/SCID background using the conventional microinjection technique. *Biol Reprod*. 2011;84(4):682-688.
241. Ethics Committee of the American Society for Reproductive M. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril*. 2005;83(6):1622-1628.
242. Ethics Committee of American Society for Reproductive M. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1224-1231.
243. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(12):971-978.
244. Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod*. 2006;3:2.
245. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006;441(7097):1109-1114.
246. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*. 2017;544(7651):488-492.
247. Mauro A, Martelli A, Berardinelli P, et al. Effect of antiprogesterone RU486 on VEGF expression and blood vessel remodeling on ovarian follicles before ovulation. *PLoS One*. 2014;9(4):e95910.
248. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim*. 2004;39(4):206-216.

249. Adler DS, Lazarus H, Nair R, et al. Safety and efficacy of bone marrow-derived autologous CD133+ stem cell therapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:506-514.
250. Bongiovanni D, Bassetti B, Gambini E, et al. The CD133+ cell as advanced medicinal product for myocardial and limb ischemia. *Stem Cells Dev*. 2014;23(20):2403-2421.
251. Ahmadi H, Baharvand H, Ashtiani SK, et al. Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Curr Neurovasc Res*. 2007;4(3):153-160.
252. Zeng H, Li L, Chen JX. Overexpression of angiopoietin-1 increases CD133+/c-kit+ cells and reduces myocardial apoptosis in db/db mouse infarcted hearts. *PLoS One*. 2012;7(4):e35905.
253. Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(5):643-652.
254. Gupta S, Lodha P, Karthick MS, Tandulwadkar SR. Role of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cell Therapy for Follicular Recruitment in Premature Ovarian Insufficiency: Review of Literature and a Case Report of World's First Baby with Ovarian Autologous Stem Cell Therapy in a Perimenopausal Woman of Age 45 Year. *J Hum Reprod Sci*. 2018;11(2):125-130.
255. Edessy M, Hosni H, Shady Y, Waf Y, Bakr S, Kamel M. Autologous stem cells therapy, The first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Medica International*. 2016;3(1):19-23.
256. Hala Gabr WAEaAE-G. Autologous stem cell transplantation in patients with idiopathic premature ovarian failure. Global Congress on Tissue Engineering, Regenerative & Precision Medicine. Vol. 7. San Antonio,: J Tissue Sci Eng; 2016:27.
257. Dincer S. Collection of hemopoietic stem cells in allogeneic female donors during menstrual bleeding. *Transfus Apher Sci*. 2004;30(2):175-176.
258. Papathanasiou A. Implementing the ESHRE 'poor responder' criteria in research studies: methodological implications. *Hum Reprod*. 2014;29(9):1835-1838.

259. Venetis CA. The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward. *Hum Reprod.* 2014;29(9):1839-1841.
260. Vernon RK, Spicer LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci.* 1994;72(10):2696-2702.
261. Anderson E, Lee GY. The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue Cell.* 1993;25(1):49-72.
262. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 1992;6(11):1942-1950.
263. Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, et al. WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. *FASEB J.* 2016;30(4):1534-1547.
264. Liu J, Deutsch U, Jeong J, Lobe CG. Constitutive notch signaling in adult transgenic mice inhibits bFGF-induced angiogenesis and blocks ovarian follicle development. *Genesis.* 2014;52(9):809-816.
265. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol.* 2016;228(2):R31-43.
266. Liu Y, Yi XC, Guo G, et al. Basic fibroblast growth factor increases the transplantation-mediated therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells following traumatic brain injury. *Mol Med Rep.* 2014;9(1):333-339.
267. Garside SA, Harlow CR, Hillier SG, Fraser HM, Thomas FH. Thrombospondin-1 inhibits angiogenesis and promotes follicular atresia in a novel in vitro angiogenesis assay. *Endocrinology.* 2010;151(3):1280-1289.
268. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:21.

269. Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-Borne Revitalization of the Aged Brain. *JAMA Neurol.* 2015;72(10):1191-1194.
270. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med.* 2014;20(6):659-663.
271. Villeda SA, Wyss-Coray T. The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging. *Autoimmun Rev.* 2013;12(6):674-677.
272. Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Bontis J, Tarlatzis BC. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2009;91(3):749-766.
273. Pandian Z, McTavish AR, Aucott L, Hamilton MP, Bhattacharya S. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(1):CD004379.
274. Kaspers GJ, Veerman AJ, Popp-Snijders C, et al. Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1996;27(2):114-121.
275. Bracewell-Milnes T, Saso S, Bora S, et al. Investigating psychosocial attitudes, motivations and experiences of oocyte donors, recipients and egg sharers: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2016;22(4):450-465.
276. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
277. Tay J, Levesque JP, Winkler IG. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int J Hematol.* 2017;105(2):129-140.
278. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20(4):265-271.
279. Tatsumi K, Otani H, Sato D, et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 2008;72(8):1351-1358.

X. ANEXOS

ANEXO I. Genes regulados por las BMDSC y las células CD133+ en tejido ovárico humano

Nombre del gen	Descripción del gen	Fold change			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
ACTR2	<i>ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)</i>	-1,09	-2,45	1,78	-1,34
AGGF1	<i>Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1</i>	1,51	1,17	4,45	3,08
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	-1,01	-1,50	2,21	2,13
AKT2	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>	1,23	1,50	2,74	2,71
AKT3	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)</i>	-1,06	-1,59	3,32	2,86
ANGPT2	<i>Angiopoietin 2</i>	-1,52	-3,72	2,82	-2,20
ANGPTL1	<i>Angiopoietin-like 1</i>	-1,26	-2,17	-1,61	-2,16
ARAF	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>	-1,34	1,23	-1,15	1,12
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>	-1,34	-2,03	3,32	3,31
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>	1,25	1,26	1,60	-1,16
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>	1,21	1,31	7,20	3,65
BCAR1	<i>Breast cancer anti-estrogen resistance 1</i>	-3,27	-3,41	2,03	-2,18
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	1,64	1,72	4,84	4,25
BMP1	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	-1,12	-1,19	-1,47	-1,46
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	1,03	-2,55	1,42	1,07
BTG1	<i>B-cell translocation gene 1, anti-proliferative</i>	-3,62	-6,25	1,93	-1,04
CASP3	<i>Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	-1,21	-2,08	4,26	4,39
CASP9	<i>Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	1,84	1,21	3,98	3,13
CBL	<i>Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence</i>	1,62	1,78	-1,37	-2,12

Nombre del gen	Descripción del gen	Fold change			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
CCND1	<i>Cyclin D1</i>	-1,49	-3,21	1,81	-1,07
CD55	<i>CD55 molecule, decay accelerating factor for complement</i>	-4,43	-6,50	3,57	-3,91
CD59	<i>CD59 molecule, complement regulatory protein</i>	1,25	-1,57	3,89	1,46
CHUK	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>	1,41	1,89	1,29	1,44
COL18A1	<i>Collagen, type XVIII, alpha 1</i>	1,19	-1,74	3,21	2,40
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-1,06	1,07	-1,39	1,28
CREB1	<i>CAMP responsive element binding protein 1</i>	1,12	1,08	1,60	1,33
CSNK2A1	<i>Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide</i>	1,02	1,07	3,97	1,11
CSNK2B	<i>Casein kinase 2, beta polypeptide</i>	-3,23	-2,06	2,97	1,64
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>	2,23	1,59	7,11	2,41
CXCL8	<i>Interleukin 8</i>	-3,80	-15,57	5,90	-4,70
DUSP1	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>	1,64	-2,97	1,33	-2,01
EDIL3	<i>EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3</i>	-6,80	-13,40	-1,94	-2,87
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	-1,13	-1,36	6,16	4,81
EPS8	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i>	-1,30	-2,87	7,91	5,21
ERAP1	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>	1,01	-1,54	7,42	4,32
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	-0,05	-1,43	1,14	-1,60
FGF7	<i>Fibroblast growth factor 7</i>	1,03	-1,32	1,93	1,80
FN1	<i>Fibronectin 1</i>	0,12	-3,66	3,14	-1,76
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	3,00	1,80	-3,55	-2,55

Nombre del gen	Descripción del gen	Fold change			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>	-3,64	-2,04	3,84	2,09
GAB1	<i>GRB2-associated binding protein 1</i>	1,97	2,07	2,79	2,96
GPI	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	-7,63	-7,61	3,22	1,12
GRN	<i>Granulin</i>	-1,36	-2,06	2,88	2,53
GSK3A	<i>Glycogen synthase kinase 3 alpha</i>	-2,97	-8,70	3,46	1,56
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>	-1,25	-1,39	-1,07	-1,45
HRAS	<i>V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	-4,67	-4,59	2,38	-12,41
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>	1,15	1,67	-2,17	-2,51
IKBKB	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>	1,40	1,27	7,81	4,73
JAG1	<i>Jagged 1</i>	2,02	1,42	3,63	1,32
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>	1,42	1,10	4,15	1,70
KL	<i>KIT ligand</i>	2,12	-2,31	8,78	1,39
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	1,31	-70,72	1,93	2,40
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	-1,80	-1,65	4,98	1,51
MAP2K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>	1,36	1,26	2,63	1,20
MAP2K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>	-1,37	-1,46	7,58	9,43
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	-1,25	-1,97	2,99	-1,19
MAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>	-1,23	2,07	3,62	1,70
MAPK8	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>	2,16	-1,60	6,03	2,22
MAPK9	<i>Mitogen-activated protein kinase 9</i>	1,15	1,35	1,96	1,18

Nombre del gen	Descripción del gen	Fold change			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
MKNK1	<i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1</i>	-2,20	-1,44	2,69	2,86
NCK2	<i>NCK adaptor protein 2</i>	-1,66	-2,90	2,62	3,03
NPR1	<i>Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A</i>	2,09	-2,54	5,24	5,85
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	-1,06	1,15	3,86	1,86
PDGFA	<i>Platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i>	1,25	-2,41	2,47	-1,92
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>	-1,67	-4,66	1,81	-1,75
PDGFD	<i>Platelet derived growth factor D</i>	1,80	-1,71	3,31	3,11
PDGFRA	<i>Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>	1,13	1,15	6,07	5,78
PDPK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>	-2,09	-2,13	1,94	-8,38
PGF	<i>Placental growth factor</i>	1,30	-1,29	1,82	-2,38
PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	-2,48	-5,34	1,78	2,07
PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	1,09	1,11	4,69	4,38
PLCG1	<i>Phospholipase C, gamma 1</i>	1,03	-1,59	-1,78	1,40
PPP2CA	<i>Protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme</i>	1,69	1,19	1,46	-1,07
PRKCA	<i>Protein kinase C, alpha</i>	1,09	-1,07	3,03	1,60
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	1,02	-1,20	1,28	-1,05
PTN	<i>Pleiotrophin</i>	2,30	-0,15	3,80	4,27
RAF1	<i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>	-1,47	-1,68	2,66	-1,23
RAP1A	<i>RAP1A, member of RAS oncogene family</i>	1,89	1,41	1,41	-1,18
RASA1	<i>RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1</i>	1,03	-2,09	4,52	3,31

Nombre del gen	Descripción del gen	Fold change			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
RHOA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>	-1,38	-1,68	3,21	1,47
RHOB	<i>Ras homolog gene family, member B</i>	-3,54	-7,79	1,11	-2,80
RNH1	<i>Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1</i>	-1,37	-1,57	3,96	2,98
RPS6KB1	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1</i>	1,72	1,29	1,89	-1,05
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>	1,32	1,12	6,23	4,29
SERPINE1	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>	-5,34	-25,81	-1,26	-1,13
SERPINF1	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1</i>	-1,42	-2,55	7,13	3,23
SHC1	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>	-1,51	-2,19	1,87	1,58
SRC	<i>V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i>	1,58	-1,12	3,68	1,89
STAB1	<i>Stabilin 1</i>	-1,55	-2,44	1,47	-1,28
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa</i>	2,15	1,35	6,04	5,48
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)</i>	-1,17	-1,48	3,21	1,59
TGFB1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>	1,30	-0,09	2,69	2,39
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>	-1,70	-5,63	2,84	1,11
TIE1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>	-1,12	-1,35	1,62	1,45
TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	-2,10	-3,07	7,54	13,10
TIMP2	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>	1,05	-1,40	5,28	3,82
TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>	1,05	-4,87	4,35	-2,06
TP53	<i>Tumor protein p53</i>	-1,04	1,35	3,00	-2,06

Nombre del gen	Descripción del gen	<i>Fold change</i>			
		D7		D14	
		BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control	BMDSC vs. Control	CD133 vs. Control
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	-9,16	-8,15	2,07	-1,47
VEGFC	<i>Vascular endothelial growth factor C</i>	-2,23	-3,27	1,77	-1,06

Fold change = valor de cambio. D7/D14= día 7/14 tras la infusión celular.

ANEXO II. Autorización procedimiento animal número A1484581669445.**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00036**

Vista la solicitud realizada en fecha **08/02/17** con nº reg. entrada **6468** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrector de Investigación e Innovación, centro usuario **ES030650001003**, para realizar el procedimiento:

“Recuperación de la función ovárica mediante el Trasplante de Médula Ósea (TMO)”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00036** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y período de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Sonia Herráiz Raya**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por **LLANES RIBAS ROGELIO** -
73502655Z
Fecha: 24/03/2017 15:35:37 CET

ANEXO III. Autorización procedimiento animal número A1429108087406.



DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2015/VSC/PEA/00124

Vista la solicitud realizada en fecha **16/06/15** con nº reg. entrada **10706** por D/Dª. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

"Recuperación de la función ovárica: efectos del Trasplante de Médula Ósea (TMO) y mecanismo responsable "

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2015/VSC/PEA/00124** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Sonia Herraiz**

Establecimiento: **Animalario Unidad Central de Investigación (Fac. Medicina y Odontología) Valencia**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 30 de junio de 2015

El director general de Producción Agraria y Ganadería

José Miguel Ferrer Arranz



ANEXO IV. Producción científica del estudiante predoctoral

I. Publicaciones científicas internacionales

A. Publicaciones directamente relacionadas con la tesis doctoral

- **Buigues A***, Marchante M*, Herraiz S, Pellicer A. “Diminished Ovarian Reserve Chemotherapy-Induced Mouse Model: A Tool for the Preclinical Assessment of New Therapies for Ovarian Damage.” *Reproductive Science*. 2019 Feb 21;1933719119831784.
doi:10.1177/1933719119831784.
- Herraiz S*, Romeu M*, **Buigues A***, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, Martínez J, Pellicer N, Pellicer A. “Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders”. *Fertility and Sterility*. 2018 Aug;110(3):496-505.e1.
doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.025.
- Herraiz S*, **Buigues A***, Díaz-García C, Romeu M, Martínez S, Gómez-Seguí I, Simón C, Hsueh AJ, Pellicer A. “Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion”. *Fertility and Sterility*. 2018 May;109(5):908-918.e2.
doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.004.

B. Publicaciones no directamente relacionadas con la tesis doctoral

- Labarta E, de Los Santos MJ, Herraiz S, Escribá MJ, Marzal A, **Buigues A**, Pellicer A. “Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization-a randomized pilot study”. *Fertility and Sterility*. 2019 Jan;111(1):86-96.
doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.09.023.
- **Buigues A***, Ferrero H*, Martínez J, Pellicer N, Pellicer A, Gómez R. “Evaluation of PAI-1 in endometriosis using a homologous immunocompetent mouse model.” *Biology of Reproduction*. 2018 Aug 1;99(2):326-335.
doi: 10.1093/biolre/iory057.

- Ferrero H*, **Buigues A***, Martínez J, Simón C, Pellicer A, Gómez R. “A novel homologous model for noninvasive monitoring of endometriosis progression.”. *Biology of Reproduction*. 2017 Feb 1;96(2):302-312. doi: 10.1095/biolreprod.116.140756. PubMed

II. Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales

A. Presentaciones orales

- “Fertility Rescue by Bone Marrow Derived Stem Cell Infusion.” Congreso: 65th Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); San Diego, CA; 6-10 Marzo, 2018. Autores: **A. Buigues**, S. Herraiz, M. Marchante, AJ. Hsueh, A. Pellicer.
- “Infusion Of Human Bone Marrow-Derived Stem Cells Improved Ovarian Function In Chemotherapy-Damaged Ovaries In Mice.” Congreso: 64th Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); Orlando, Florida; 15-18 Marzo, 2017. Autores: S. Herraiz, **A. Buigues**, M. Romeu, C. Díaz-García, A.J. Hsueh, A. Pellicer.
- “Optimization of the ovarian reserve in Poor Responder patients by ovarian autologous transplantation of mobilized-bone marrow derived stem cells.” Congreso: 32nd Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Helsinki, Finlandia; 3-6 Julio, 2016. Autores: **A. Buigues**, S. Herraiz, M. Romeu, S. Martínez, P. Solves, L. Martínez, A. Pellicer. ESHRE.
- “El trasplante de células madre derivadas de médula ósea promueve la vascularización y el crecimiento folicular en corteza ovárica xenotrasplantada de pacientes bajas respondedoras.” Congreso: 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF); 16-19 Marzo, 2016. Autores: S. Herraiz, **A. Buigues**, C. Díaz-García, M. Romeu, A. Garcia-Belda, A. Pellicer.
- “Autologous stem cell ovarian transplant (ASCOT), allowed 5 pregnancies in poor responders (PR) women.” Congreso: 34th Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Barcelona, España; 1-4 Junio, 2018. Autores: N.

- Pellicer, S. Herraiz, M. Romeu, S. Martínez, **A. Buigues**, I. Gómez-Seguí, J. Martínez, A. Pellicer.
- “Two live birth after Stem cell ovarian auto-transplantation in Poor Responder women.” Congreso: 33rd Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Geneva, Suiza; 2-5 Julio, 2017. Autores: M. Romeu, S. Herraiz, S. Martínez, C. Díaz-García, P. Solves, I. Gómez, J. Martínez, **A. Buigues**, C. Simón, D. Galliano, A. Pellicer.
 - “Validez de los modelos animales scid para la evaluación del riesgo de desarrollo de leucemia.” Congreso: 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF); 16-19 Marzo, 2016. Autores: **A. Buigues**, S. Herraiz, E. Villamón, E. Such, A. Pellicer, C. Díaz-García.
 - “LH gonadoprotection against ovarian damage induced by alkylating drugs in adult mouse ovaries.” Congreso: 34th Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Barcelona, España; 1-4 Junio, 2018. Autores: L. Del Castillo, **A. Buigues**, L. Pellegrini, V. Rossi, F. Klinger, A. Pellicer, S. Herraiz
 - “Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to ICSI to improve oocyte and embryo quality in IVF patients. A Randomized Pilot Study.” Congreso: 34th Annual Meeting of the European-Society-of-Human-Reproduction-and-Embryology (ESHRE); Barcelona, España; 1-4 Junio, 2018. Autores: E. Labarta, S. Herraiz, MJ. De los Santos, A. Marzal, MJ. Escribá, **A. Buigues**, A. Pellicer.
 - “Trasplante autólogo de corteza ovárica en babuinos tras incubación ex-vivo con tacrolimus y su efecto sobre el daño isquemia-reperfusión.” Congreso: 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF); 16-19 Marzo, 2016. Autores: S. Fernández Prada, S. Herráiz Raya, A. García-Belda, **A. Buigues**, J. Subirá, M. Brännström, C. Díaz-García
 - Patrón de expresión genómica y fosforilación de la ruta PI3K-AKT en tejido ovárico fresco y previamente criopreservado de pacientes oncológicas tras activación in vitro con inhibidores de PTEN. Congreso: 31º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF); 16-

19 Marzo, 2016. Autores: S. Herraiz, C. Díaz-García, **A. Buigues**, A. García-Belda, E. Novella-Maestre, A. Pellicer.

B. Posters

- “Transcriptomic Changes and Paracrine Factors Involved in Ovarian Rejuvenation Induced by Stem Cell.” Congreso: 66th Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); Paris, Francia; 12-16 Marzo, 2019. Autores: **Buigues A**, Pellegrini L, Sebastian-Leon P, Diaz-Gimeno P, Pellicer A, Herraiz S.
- Bone Marrow Derived Stem Cells Promote Vascularization and Follicular Growth in Xenografted Human Ovarian Cortex. Congreso: 63rd Annual Scientific Meeting of the Society-for-Reproductive-Investigation (SRI); Montreal, Canada; 16-19 Marzo, 2016. Autores: S. Herraiz, **A. Buigues**, M. Romeu, C. Díaz-García, A.J. Hsueh, A. Pellicer.
- “Evaluation of the potential therapeutic role of a PAI-1 inhibitor (PAI-0039) in the treatment of endometriosis in a homologous mouse model.” Congreso: 13th World Congress on Endometriosis (WCE); Vancouver, Canada; 17-20 Mayo, 2017. Autores: V. Rodríguez, **A. Buigues**, J. Martínez, A. Cano, A. Pellicer, R. Gómez.

III. Premios y menciones

- “SRI-Pfizer Award” por el trabajo “Fertility Rescue by Bone Marrow Derived Stem Cell Infusion”, concedido por la Sociedad para la Investigación Reproductiva (SRI) en 2018 como uno de los 25 mejores trabajos presentados.
- Primer premio a la mejor investigación básica por el trabajo “El trasplante de células madre derivadas de médula ósea promueve la vascularización y el crecimiento folicular en corteza ovárica xenotrasplantada de pacientes bajas respondedoras.” Concedido en 2016 por la Sociedad Española de Fertilidad.